



FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA
EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE GRANADA
(*Punica granatum* L. Var. Smith) EMPLEANDO CO₂
SUPERCRÍTICO**

**PRESENTADA POR
KAREN MAKIKADO KAMIMOTO**

**ASESOR
DIÓMEDE FERNANDO RAMOS ESCUDERO**

**TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS**

LIMA – PERÚ

2020



CC BY-NC-SA

Reconocimiento – No comercial – Compartir igual

El autor permite transformar (traducir, adaptar o compilar) a partir de esta obra con fines no comerciales, siempre y cuando se reconozca la autoría y las nuevas creaciones estén bajo una licencia con los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



USMP
UNIVERSIDAD DE
SAN MARTÍN DE PORRES

FACULTAD DE
INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA EXTRACCIÓN
DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE GRANADA (*Punica granatum*
L. Var. Smith) EMPLEANDO CO₂ SUPERCRÍTICO**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERA DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTADA POR

MAKIKADO KAMIMOTO, KAREN

LIMA – PERÚ

2020

DEDICATORIA

A Dios.

A mi familia.

A mis buenos amigos.

Por su apoyo constante,
consejo oportuno y palabras de aliento.

AGRADECIMIENTO

A mi asesor, Dr. Fernando Ramos Escudero,
por haberme orientado con sus conocimientos y
dedicado su apoyo incondicional durante
todo el progreso de este trabajo de investigación.

A la empresa Duna Corp S.A. y
a la ingeniera Flor de María Vásquez
por haberme facilitado las semillas de granada
para el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	x
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1 Situación problemática	1
1.2 Definición del problema	2
1.3 Formulación del problema	2
1.4 Objetivos de la investigación	3
1.5 Viabilidad de la investigación	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Antecedentes de investigaciones	5
2.2 Bases teóricas	6
2.3 Definición de términos básicos	9
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	23
3.1 Lugar de ejecución	23
3.2 Materia prima	23
3.3 Reactivos, materiales y equipos	25
3.4 Método de análisis	26

3.5 Análisis estadístico	30
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	31
4.1 Extracción de aceite de semilla de granada	31
4.2 Perfil de ácidos grasos	32
4.3 Características cromáticas	36
4.4 Dienes y trienos conjugados	37
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	39
5.1 Extracción de aceite de semilla de granada	39
5.2 Perfil de ácidos grasos	43
5.3 Características cromáticas	46
5.4 Dienes y trienos conjugados	47
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES	52
FUENTES DE INFORMACIÓN	53
ANEXOS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Semillas de balsamina, marigold, catalpa, caléndula, jacaranda y granada	8
Figura 2. Diseño experimental	24
Figura 3. Cromatograma del perfil de ácidos grasos POS0, POS75, POS85, POS100	35
Figura 4. Aceites extraídos POS0, POS75, POS85, POS100	36
Figura 5. Parte leñosa dura de la semilla de granada	66
Figura 6. Perfil de ácidos grasos de aceite de semilla de granada	68
Figura 7. Cromatograma de FAMEs en aceite de semilla de granada	69
Figura 8. Cinética de rendimiento de los tratamientos	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ácidos linolénicos conjugados en aceites	8
Tabla 2. Composición proximal de la semilla de granada	11
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del aceite de semilla de granada	12
Tabla 4. Componentes minoritarios del aceite de semilla de granada	13
Tabla 5. Análisis proximal de la semilla de granada antes del tratamiento térmico	31
Tabla 6. Rendimientos según tratamientos	32
Tabla 7. Resultados de perfil de ácidos grasos en porcentajes (%)	33
Tabla 8. Tiempos de retención de los ácidos grasos analizados en POS	34
Tabla 9. Resultados de color del aceite extraído según el tratamiento térmico	37
Tabla 10. Resultados de dienos y trienos del aceite extraído según el tratamiento térmico	38
Tabla 11. Comparación extracción CO ₂ supercrítico y Soxhlet	65
Tabla 12. Comparación de tiempos de retención del ácido punícico	66
Tabla 13. Composición de ácidos grasos en aceite de semilla de granada	67

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del tratamiento térmico sobre la extracción, el perfil de ácidos grasos, las características cromáticas y los dienos y trienos conjugados del aceite en las semillas de granada (*Punica granatum* L. Var. Smith). Para la extracción del aceite de las semillas de granada (POS), se empleó CO₂ supercrítico y fueron previamente sometidas a diferentes tratamientos térmicos: blanco (POS0), 75°C (POS75), 85°C (POS85) y 100°C (POS100) por 10 minutos, respectivamente. Los resultados fueron: el rendimiento del POS disminuyó conforme se incrementó la temperatura del tratamiento térmico. El POS100 presentó el menor porcentaje de rendimiento (6.95%). En todos los tratamientos, el ácido punícico fue el mayor (41.23-48.37%), y en menor proporción el ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico, catálpico y β -eleosteárico. Los valores de L*, a* y b* en el POS aumentaron conforme la temperatura del tratamiento se incrementó de 46.75 a 50.75, de -0.67 a -4.23, y de 27.90 a 31.19, respectivamente. Los valores de K₂₃₂ y K₂₇₀ disminuyeron conforme aumentó la temperatura, de 3.90 a 3.84 y de 3.50 a 3.45, respectivamente. El POS puede ser empleado como alimento funcional o nutracéutico por los beneficios que se obtendrían por la ingesta del ácido punícico.

Palabras clave: *Punica granatum* L., semillas, lípidos, ácido punícico, CO₂ supercrítico

ABSTRACT

The objective of this investigation was to determine the effect of the heat treatment on the extraction, fatty acid profile, chromatic characteristics and conjugated dienes and trienes of the oil in pomegranate seeds (*Punica granatum* L. Var. Smith). Supercritical CO₂ was employed to extract the pomegranate seed oil (POS) and previously the pomegranate seeds had different heat treatments: without heat treatment (POS0), 75°C (POS75), 85°C (POS85) and 100°C (POS100) for 10 minutes, respectively. The results were: the yield of POS decreased as the heat treatment temperature increased. The POS100 presented the lowest percentage in yield (6.95%). In all treatments, puniic acid was the highest (41.23-48.37%), other fatty acids were found in less concentration: palmitic, stearic, oleic, linoleic, catalpic and β -eleostearic acids. The values of L*, a* and b* in the POS increased as the treatment temperature increased from 46.75 to 50.75, from -0.67 to -4.23, and from 27.90 to 31.19, respectively. The K₂₃₂ and K₂₇₀ values decreased as the temperature increased, from 3.90 to 3.84 and from 3.50 to 3.45, respectively. The POS can be considered as a functional or nutraceutical food for the benefits that would be obtained by the consumption of puniic acid.

Keywords: *Punica granatum* L., seeds, lipids, puniic acid, supercritical CO₂

INTRODUCCIÓN

Debido a que el procesamiento industrial de alimentos sigue generando más cantidades de residuos, se ha convertido en un problema mayúsculo, y por lo cual se deben disminuir los niveles de desechos y contaminación ambiental. Actualmente, existen investigaciones para el aprovechamiento de los subproductos de la agroindustria como una fuente de productos nutraceuticos, obtenidos de manera natural, un ejemplo de ello es la granada y sus semillas (Kalamara, Goula & Adamopoulos, 2015).

La granada (*Punica granatum* L.) es una de las frutas investigadas desde la antigüedad, debido a sus múltiples beneficios para la salud que se pueden obtener de sus partes comestibles; y a pesar de que el procesamiento del zumo genera grandes cantidades de semillas, todavía se le considera solo como residuos que sirven para la alimentación animal o bien en la producción de cosméticos.

Según Eikani et al., (2012) por cada kilo de fruta, se obtienen 37-143 gramos de semillas, que tienen propiedades biológicas. Poseen generalmente entre 12 – 20% de grasa y tienen mayor potencial y mejor aprovechamiento en el sector de alimentos ya que el aceite obtenido presenta varios efectos que mejoran la salud, entre ellos, el efecto antidiabético o antioxidante (Shabbir et al., 2017).

Últimamente, el aceite de granada ha generado interés por sus múltiples propiedades ya mencionadas, y principalmente, por su alto contenido de ácido punícico (36%), isómero del ácido α -linolénico conjugado (CLNA); α -eleosteárico

(12%); catálpico (11%) y β -eleosteárico (8%), cuyas concentraciones dependerán según la variedad, condiciones de cultivo, clima, etc. (Elfalleh et al., 2011).

El ácido punícico presenta gran porcentaje del total de ácidos grasos entre 40 a 80% sólo en los lípidos de procedencia vegetal y contribuye a reducir los efectos de obesidad y además regula el metabolismo lipídico (Hennessy et al., 2010 & Yuan et al., 2014).

Por tanto, esta investigación muestra las características del POS, obtenido de la variedad Smith que se cultiva en el Perú. Para ello, se emplearon técnicas de extracción mediante dióxido de carbono supercrítico y a través de análisis innovadores, los que servirán como fuente para futuros estudios y aplicaciones en la industria alimentaria.

La presente tesis está estructurada en cinco (5) capítulos. El primero, aborda el planteamiento del problema, los objetivos y la viabilidad de la investigación. El segundo, trata sobre el marco teórico, antecedentes, bases teóricas y definición de términos. En el tercero, se presenta el proceso de extracción del POS con dióxido de carbono supercrítico, los métodos de análisis, materiales, reactivos y equipos. En el cuarto, se explican los resultados del proceso de extracción del aceite de semilla de granada, el perfil de ácidos grasos, las características cromáticas, dienos y trienos conjugados. Y en el quinto capítulo, se exponen las características y beneficios del ácido punícico.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Situación problemática

El Ministerio de Agricultura y Riego (2019) evalúa a la granada como una de las nuevas superfrutas más cotizadas de las agroexportaciones en nuestro país y es muy apreciada, a nivel mundial, por sus múltiples propiedades antioxidantes, farmacológicas, anticancerígenas, antitumorales, antimicrobiana y hepaprotectora. Además, es reconocida por su contenido de minerales y vitaminas, entre los que resaltan el potasio, fósforo, manganeso, calcio, hierro, magnesio, vitamina C, vitamina B1 y vitamina B2.

La creciente demanda por alimentos funcionales obliga que países, tradicionalmente productores generen ventanas comerciales, y el Perú cuenta con 5 regiones productoras de granada: Ica (81.1%), Lima (10.5%), La Libertad (5.3%), Áncash (1.0%), otros (2.2%).

La granada se puede consumir en estado fresco, jugo o simplemente los arilos. Recientemente, en muchos países productores, se elaboran mermeladas, confituras, helados, cremas, geles, entre otros. En el caso del procesamiento de zumos, jugos o pulpas. El volumen de semillas, generadas por cada tonelada de arilos congelados es del

24%, que comúnmente se emplea para alimento de ganado, en la industria de los cosméticos o simplemente, se desecha.

Sin embargo, diversas investigaciones demuestran que estos desechos de la granada, como la semilla y el aceite, poseen compuestos bioactivos de buena calidad que ayudan a prevenir y curar múltiples enfermedades.

1.2 Definición del problema

¿Cómo afecta el tratamiento térmico previo, en la extracción del aceite, obtenido de la semilla de granada (*Punica granatum* L. Var. Smith) empleando dióxido de carbono supercrítico?

1.3 Formulación del problema

Es inevitable que la industria alimentaria genere constantemente subproductos de sus procesos industriales, por lo que muchas y sobretodo, en el sector de bebidas, luego del procesamiento de los jugos, se desechan cáscaras y semillas de las frutas o verduras. No obstante, investigaciones recientes muestran que estos desechos aún tienen un alto valor que se puede aprovechar, por ejemplo, la semilla de granada (*Punica granatum* L.), es una fuente de aceite que presenta prometedoras características saludables para la salud por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y otros compuestos bioactivos (Jing et al., 2012; Fernández et al., 2015; Aruna et al., 2016). Adicionalmente, investigaciones de (Melo et al., 2014; Yuan et al., 2014; Hennessy et al., 2010) muestran que posee capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, entre otras.

En la actualidad, varios estudios demuestran que el aceite de semilla de granada contiene aproximadamente entre 65% - 80% de ácido púnicico (C18:3

- 9c, 11t, 13c) (Aruna et al., 2016; Parashar et al., 2010) y entre 30% - 60% de ácido α -eleosteárico (C18:3-9c, 11t, 13t) (Aruna et al., 2016; Saha et al., 2012, Khoddami et al., 2014), que también proveen grandes aportes a la salud.

Por lo que con este proyecto de investigación se planteó básicamente el aprovechamiento de los residuos del procesamiento de zumo de granada de la empresa Duna Corp S.A., con el fin de extraer su aceite que contiene el ácido punícico, el cual presenta diversos beneficios para la salud y aplicaciones en la industria alimentaria, empleando dióxido de carbono supercrítico como método de extracción y aplicación de diferentes tratamientos térmicos a la semilla de granada.

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto del tratamiento térmico sobre la extracción del aceite de las semillas de granada (*Punica granatum* L. Var. Smith) empleando CO₂ supercrítico.

1.4.2 Objetivos específicos:

- Determinar el rendimiento de extracción del aceite aplicando tratamiento térmico previo a las semillas de granada.
- Determinar el efecto del tratamiento térmico sobre el perfil de ácidos grasos del aceite obtenido mediante cromatografía gaseosa.
- Medir la variación de las características cromáticas por el efecto del tratamiento térmico del aceite obtenido de la semilla de granada.
- Analizar el efecto de los tratamientos térmicos sobre los dienos y trienos conjugados del aceite obtenido de la semilla de granada.

1.5 Viabilidad de la investigación

1.5.1 Viabilidad técnica

Se cuenta con equipos a disposición dentro y fuera de la universidad, adicionalmente, de laboratorios acreditados para análisis externos, y finalmente se encuentra investigaciones sobre extracciones con CO₂ supercrítico, tesis referentes al empleo de la granada y su aceite como objeto de estudio.

1.5.2 Viabilidad social

Este proyecto también presenta una responsabilidad con la sociedad ya que los resultados obtenidos sobre los beneficios del aceite extraído de las semillas de granada sirven como información novedosa e importante para la salud, también incrementará el consumo de productos naturales de variedades peruanas. Adicionalmente, tiene un valor importante en el aspecto ambiental, ya que ayuda a reducir los desechos industriales, y el método de extracción con fluidos supercríticos es una tecnología que no requiere solventes químicos, no es tóxica y se obtienen productos puros.

1.5.3 Viabilidad económica

Se cuenta con la materia prima para esta investigación que fue donada por una empresa que desecha las semillas de granada luego de su procesamiento en planta. Y los demás costos provienen del capital del investigador.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de investigaciones

Los resultados de la investigación a partir del aceite de semilla de granada (*Punica granatum*) de la variedad Wonderful de la investigación de Gutiérrez & Terrones, (2016) que crece en el Perú mostraron un rendimiento del 15% mediante expeller considerando 9.5% de humedad inicial en la muestra.

Llaguento & Romero, (2014) observaron que las variables con mayor influencia fueron del tamaño de partícula y tiempo durante la extracción en su evaluación de la extracción de aceite esencial de la semilla de granada (*Punica granatum*) de la variedad Wonderful mediante el método de arrastre con vapor, por lo que acondicionaron tres diferentes tamaños y tiempos.

Churata, (2018) comparó la extracción de aceite de semillas de uva de variedad Quebranta mediante soxhlet y, CO₂ supercrítico, el cual mostró un sobresaliente rendimiento (16.15%), mejores propiedades fisicoquímicas y mayor concentración de ácido linoléico, empleando 188 bar, 33.5°C y 57 g/min de flujo de CO₂.

Durdević et al, (2017) investigó la radiación con microondas como pretratamiento para aumentar el rendimiento del aceite de semilla de granada en

la extracción supercrítica con CO₂ y n-hexano. Obtuvieron un máximo rendimiento de aceite en extracción con soxhlet (36.3%) con radiación de 600 W por 6 minutos, y para la extracción con CO₂ supercrítico, fue de 27.2% con 250 W por 6 minutos. En ambos casos, el ácido púnic fue el ácido graso más abundante (>60%).

En la investigación de Liu et al., (2012) demostraron que la presión es el factor que ejerce mayor rendimiento durante la extracción de aceite empleando CO₂ supercrítico. Asimismo, Dorado et al., (2016) explicaron que el rendimiento aumenta cuando la presión aumenta, ya que también aumenta la densidad del CO₂ supercrítico y al mismo tiempo, aumenta la capacidad de solvatación del aceite.

El estudio de Zanabria, (2012) expuso que el aceite extraído de la semilla de sacha inchi tuvo un rendimiento de 39.9%, inocuo, y características propias de sabor y olor, empleando 50°C, 450 bar, cuatro horas de extracción y 8 ml/seg de flujo de CO₂.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Ácidos grasos conjugados

Los ácidos grasos conjugados según Carvalho et al, (2010) son los isómeros posicionales y geométricos de los ácidos grasos poliinsaturados con enlaces dobles, los cuales han llamado la atención de los científicos porque generan muchos beneficios para salud. Los ácidos grasos conjugados del ácido linoleico (CLA) se encuentran usualmente en productos lácteos y derivados de los animales rumiantes. Y los conjugados del ácido α -linolénico (CLnA) provenientes mayormente de las semillas de origen vegetal, conforman el ácido graso mayoritario dentro de su composición y se producen a partir de una enzima

conjugasa específica que transforma el ácido linolénico en el principal ácido graso conjugado en la semilla.

En algunas semillas oleaginosas, la acción catalítica del ácido graso desaturasa (FAD2) y (FAD3) a partir del ácido oleico (18:1 Δ 9cis) produce el ácido linoleico (18:2 Δ 9cis, 12cis) y el ácido α -linolénico (18:3 Δ 9cis, 12cis, 15cis) respectivamente. Sin embargo, en otras plantas, existen reacciones adicionales que mediante las estructuras modificadas de los FAD2, las conjugasas de ácidos grasos (FADX), emplean el ácido linoleico o el α -linolénico como sustratos para la conversión a sus conjugados. Es así como en las semillas de *Trichosanthes kirilowii* (pepino chino) y *Punica granatum* (granada), los FADX catalizan la transformación del doble enlace Δ 12cis del ácido linoleico a Δ 11trans y Δ 13cis para formar el ácido punícico (18:3 Δ 9cis, 11trans, 13cis) (Holic et al., 2018).

Algunas semillas que contienen CLnA son: las semillas de Marigold con 62.2% de ácido caléndico (8t,10t,12c-18:3), las semillas de granada con 83% del ácido punícico (9c,11t,13c-18:3), las semillas de balsamina con 56.2% de α -eleosteárico (9c,11t,13t-18:3), y por último, las semillas de catalpa con 42.3% de ácido catálpico (9t,11t,13c-18:3). Y según algunas investigaciones, éstos CLnA son antiinflamatorios, anticancerígenos, ayudan a reducir la obesidad, entre otros Tanaka et al., (2011).

En la tabla 1, se muestran los principales ácidos linolénicos conjugados que se encuentran en las semillas (1) Balsamina, (2) Marigold, (3) Catalpa, (4) Caléndula, (5) Jacaranda, (6) Granada. Y en la figura 1, se muestran sus imágenes respectivas.

Tabla 1. Ácidos linolénicos conjugados en aceites

Aceite de semilla	Tipo de CLN	Isómeros	CLNA (%)
1. Balsamina	α -eleosteárico	9c, 11t, 13t-18:3	>50
	ácido β -eleosteárico	9t, 11t, 13t-18:3	
2. Marigold	α -caléndico	8c, 10t, 12c-18:3	>30
	β -caléndico	8t, 10t, 12t-18:3	
3. Catalpa	ácido catálpico	9t, 11t, 13c-18:3	>40
4. Caléndula	ácido caléndico	8t, 10t, 12c-18:3	>55
5. Jacaranda	ácido jacárico	8c, 10t, 12c-18:3	>35
6. Granada	ácido punícico	9c, 10t, 13c-18:3	>70

Fuente: Tanaka et al., (2011)



Figura 1. Semillas de (1) balsamina, (2) marigold, (3) catalpa, (4) caléndula, (5) jacaranda y (6) granada.

Fuente: Tanaka et al, (2011)

Algunos procesos que involucran tratamientos térmicos como freír, hervir, hornear, asar, cocción a vapor, secado, pasteurización, ahumado, extrusión, entre otros, ocasionan distintos impactos en los alimentos como: inactivación de enzimas, toxinas o patógenos, prolongan la vida útil, aumentan la biodisponibilidad de nutrientes, mejoran textura, sabor o color, e incluso contribuyen a activar propiedades antioxidantes. Sin embargo, si estos procesos no son controlados, también pueden producir daños generando compuestos indeseados o reduciendo las cantidades de nutrientes. Es así, como en el proceso de tostado de café, se controla la temperatura, para que por efecto del calor en el grano, se intensifique su aroma y sabor que aumentan su calidad y lo hacen más deseable en el consumidor, es decir, el efecto del tratamiento térmico proporciona una mayor biodisponibilidad y funcionalidad de algunos compuestos (Boekel et al., 2010). Es por ello, que en esta investigación se someterán las semillas a diferentes tratamientos térmicos para evaluar cuál sería el mejor tratamiento térmico para obtener mayores beneficios, considerando altos rendimientos y mejor calidad, del aceite extraído con CO₂ supercrítico.

2.3 Definición de términos básicos

2.3.1 Granada: origen, clasificación y composición

Según Shaygannia et al., (2015) la granada es nativa de Irán. Sin embargo, Melgarejo, (2010) menciona que debido a su viable difusión y desarrollo, actualmente se encuentra una gran variedad genética apta en cualquier parte del mundo, y principalmente en: España, India, Turkmenistán, Irán, Chile, Perú, Argentina, EE.UU, Sudáfrica, Australia, China, Turquía, Egipto, Israel, entre otros.

La granada proviene de la familia *Punicaceae* y está constituida por un género y dos especies, siendo comestible solamente la especie *Punica granatum* L. Y por el contrario, la especie *Punica nana* L. es de menor tamaño, de uso decorativo y no es comestible. Según (Uribe, 2016) describe la clasificación botánica de la granada como:

División: Fanerógamas

Subdivisión: Angiospermas

Clase: Dicotiledonea

Orden: Myrtales

Familia: Punicaceae

Género: *Punica granatum* L

Debido a la definición de alimentos funcionales descritos como “alimentos que contienen componentes biológicamente activos que benefician la salud y reducen el riesgo de enfermedades” (Melgarejo, 2010) comenta que la granada se puede considerar como alimento funcional. Asimismo, en los últimos estudios se dan a conocer que la granada es una baya conformada por 8 carpelos, con arilos en su interior entre 58-75%, mientras que las membranas carpelares y corteza, conforman entre el 25-42% del peso total.

Los arilos son pulposos y comestibles (con 80% de agua) con testa carnosa y dependiendo de su variedad, el color puede ser rosa o granate. Contienen azúcares, ácidos grasos poliinsaturados, vitamina C, potasio, fibra, etc. Y se aconseja su consumo porque es bajo en calorías y tiene cualidades antioxidantes debido a los elagitaninos y antocianos.

Asimismo, las semillas de la granada están formadas por una capa dura, gruesa y leñosa que cubre el material lipídico y constituye entre 5% - 15% con alto contenido en fibra y grasa. Y la parte principal de grasa dentro de esta capa varía entre 12% - 20%, el cual es importante debido a su alta composición en ácidos grasos poliinsaturados, el cual es considerado como un parámetro de

calidad y tiene propiedades preventivas de enfermedades cardiovasculares que reducen los niveles de HDL-colesterol.

En la tabla 2, se muestra la composición proximal de la semilla de granada según Mahesar et al., (2019)

Tabla 2. Composición proximal de la semilla de granada

Componente	Valor
Cenizas (%)	0.47-1.887
Grasa (%)	13.5-19.3
Humedad (%)	77.72
Proteína (%)	4.45-18.34
Fibra cruda (%)	13.78-42.4
Carbohidratos (%)	24.09-35.44
Energía (Kcal/100 g)	355.52-460.7

Fuente: Mahesar et al., (2019)

2.3.2 Aceite de granada

El aceite de semilla de granada que también se le denomina en inglés POS (pomegranate seed oil), representa el 12-20% en peso de las semillas, siendo el conjugado del ácido graso octadecatrienólico, o también llamado ácido punícico (C18:3-9cis, 11trans, 13cis). Se encuentra generalmente mayor al 65% de ácidos grasos totales pero puede variar según el área de cultivo, condiciones climáticas, estado de madurez, manejo postcosecha, entre otros (Miguel et al., 2010). Sassano (2009), comenta que además de presentar ácidos grasos insaturados como el oleico y linoleico; también posee una cantidad considerable de los derivados del ácido α -linolénico conjugado (CLnA), los cuales se caracterizan por tener tres dobles enlaces, usualmente en las posiciones de los carbonos número (9, 11, 13) u (8, 10, 12), cis o trans.

Otras propiedades que se mencionan sobre el POS, es su poder antioxidante, anticancerígena, neuroprotectora, antiinflamatoria, antidiabéticas y antiobesidad. Actúa previniendo la aterosclerosis y ayuda a detener el fotoenvejecimiento de la piel, entre otros (Natolino & Da Porto, 2019).

Por lo que la composición del POS puede promover la investigación para conocer más de sus propiedades benéficas para la salud, incluyendo el control de peso y grasa en el organismo, además de la reparación de la piel (Johanningsmeier et al., 2011). Actualmente, ya se está empleando en aplicaciones para productos de belleza, sazonadores, y aplicaciones medicinales (Viuda-Martos et al., 2010).

Caligiani et al., (2010) recalcó la concentración de componentes bioactivos como escualeno (800 mg/kg), policosanol (118-185 mg/kg) y β -sitosterol (8069 mg/kg) en el aceite de semilla de granada que se pueden aprovechar para formular suplementos alimentarios que eviten la hipercolesterolemia en las personas.

En la tabla 3, se presentan parámetros del POS según bibliografía de varios investigadores.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del aceite de semilla de granada

Parámetros	Valor
Gravedad específica a 28°C (g/cm ³)	0.93
Viscosidad a 25°C (m Pas.s)	0.037
Acidez (%)	0.96-8.36
Índice de saponificación (mg/KOH)	156-182.5
Índice de peróxido (meq O ₂ /100g)	0.39-3.42
Índice de yodo (g I ₂ /100 g)	212-220.34
Dienos conjugados	4.15
Trienos conjugados	3.95

Fuente: Mahesar et al., (2019)

Tabla 4. Componentes minoritarios del aceite de semilla de granada

Componente	mg/100 g de aceite
Escualeno	78.1±4.1
Fitosteroles	
Campesterol	36.4±2.0
Estigmasterol	17.5±1.8
B-sitosterol	296.8±13
Sitostanol	16.2±2.9
Otros	50.3±3.8
Tocoferoles	
α-tocoferol	15.6±3.5
γ-tocoferol	194.0±8.7
δ-tocoferol	9.3±1.1

Fuente: Siano, (2016)

En la investigación de Silva et al., (2019) el POS se mostró como una de las principales fuentes de isómeros del ácido linolénico (80% de CLnA) donde los componentes mayoritarios fueron el ácido punícico, catálpico, α-eleosteárico y β-eleosteárico, que previenen algunos tipos de cáncer, fortifican el sistema inmune, disminuyen enfermedades cardiovasculares y obesidad. Adicionalmente, sus componentes bioactivos como fenoles, tocoferoles y fitosteroles, aminoran los niveles de estrés, inflamación y a favorecen a tener menores riesgos de enfermedades crónicas.

Holic et al., (2018) menciona que por tonelada métrica el precio del POS según cifras del 2017 de la plataforma de Alibaba, puede variar entre USD

2,000 a 100,000. Sin embargo, los precios actualizados al presente año 2020, oscilan entre USD 110 a 500 por kilogramo, importándolo desde China o India.

2.3.3 Ácido punícico

También llamado como el nuevo omega 5, el ácido punícico es un ácido graso poliinsaturado de cadena larga con tres dobles enlaces en las posiciones 9cis, 11 trans, 13cis. Es un isómero del ácido α -linolénico conjugado (CLnA) con composición química parecida al ácido linoléico (CLA) y ácido α -linolénico (LnA). Se desarrolla naturalmente en las semillas de granada *Punica granatum*, y en altas concentraciones (Natolino y Da Porto, 2019). La denominación IUPAC de ácido punícico es 9Z, 11E, 13Z-octadeca-9, 11, 13-ácido trienoico (por la presencia de tres enlaces dobles) que tiene superior actividad fisiológica que los ácidos grasos dienoicos, como el ácido linoleico conjugado (CLA) (Aruna et al., 2016)

El ácido punícico se encuentra en las semillas de la granada en forma de triglicérido, que reserva energía y acumula los lípidos. Holic et al., (2018) mencionó que el ácido punícico adicionalmente disminuye la posibilidad de contraer el cáncer porque es quimiopreventivo, y también contribuye a prevenir la diabetes, obesidad, inflamaciones, es un buen antioxidante, etc. Las plantas solo pueden almacenar un tipo de CLN o ácido graso linolénico conjugado como mayoritario, y es el ácido púnico, el mayoritario presente en el aceite de semilla de granada.

Sin embargo su concentración puede variar por varios factores como estado de madurez del fruto, condiciones climáticas o incluso entre variedades de una misma región. Habibnia et al., (2012) en cinco variedades de granadas provenientes de Irán, observó que las concentraciones de ácidos grasos variaban: punícico (78.25% - 82.40%), linoleico (5.22% - 7.08%), oleico (5.71% - 7.48%), esteárico (1.99% - 2.54%) y palmítico (2.95% - 3.57%) en su perfil de ácidos grasos.

En la semilla de granada aproximadamente el 95% de su aceite lo conforman triglicéridos, de los cuales su 80% es ácido punícico, al cual se le ha considerado como componente fundamental con actividad biológica anticancerígena y antiobesidad, ya que en estudios in vitro e in vivo en ratones, los resultados demostraron que el poder citotóxico del ácido punícico es favorable debido a la posición de sus dobles enlaces que posibilitan una mejor respuesta inmune, además porque entre sus funciones es reducir el tejido adiposo (Koba & Yanagita, 2011).

2.3.4 Tipos de extracción de aceite

2.3.4.1 Extracción química

La extracción de aceites de las semillas se puede realizar mediante varios procedimientos, sin embargo el rendimiento principalmente va depender de las ventajas y desventajas del método escogido. Una opción con altos rendimientos y la más aplicada en todo el mundo, es la extracción química mediante soxhlet, que emplea un balón con solvente orgánico conectado a un tubo de extracción soxhlet y se calienta hasta que el solvente alcanza su punto de ebullición, comienza a evaporar y sube por los tubos en forma de gas hasta que llega al condensador, donde por efecto de la temperatura del agua fría se condensa y pasa a través del cartucho que contiene a la muestra extrayendo su aceite, por lo que se va acumulando disolvente y grasa, hasta una cierta altura donde el tubo se llena y sifonea, de manera repetitiva y continua. Luego, la mezcla obtenida, se debe eliminar el solvente, usualmente se emplea un rotavapor y finalmente queda solo la grasa. Este método comúnmente se lleva a cabo por largos periodos de tiempo y con altas temperaturas. El solvente más recomendado es el éter de petróleo pero es volátil y pueden quedar trazas del

solvente en la muestra de aceite, lo cual no es recomendable si son aceites con aplicaciones en la industria alimentaria (González et al., 2009).

2.3.4.2 Extracción por prensa hidráulica y expeller

Cefla, (2015) menciona que el sistema con prensa hidráulica discontinúa el más solicitado especialmente para la extracción de aceites vegetales de grado alimentario, antes se aplicaba presión sobre la muestra envuelta en telas con ayuda de palancas; sin embargo con el paso del tiempo se modificó y actualmente se han reemplazado por un sistema hidráulico más eficiente que soporta mayores presiones. En cambio, el prensado continúa mediante el expeller o prensa tornillo soportan mayores niveles de presión y tiene rendimientos de extracción de aceite de semillas entre 90 - 95%. Uno de los parámetros importantes a tener en cuenta en este método, es el porcentaje de humedad de la muestra, ya que durante la extracción las moléculas de agua presentes pasan por la muestra y cumplen la función principal de ablandar los tejidos celulares que junto con la presión ejercida facilitan la salida del material lipídico de la muestra y aumenta el rendimiento del aceite. De lo contrario, si el porcentaje de humedad es $< 7\%$, el expeller se obstruye, no extrae aceite, malogra el motor más fácilmente y todas sus piezas se deben volver a lavar y secar apropiadamente para las nuevas extracciones.

2.3.4.3 Extracción por dióxido de carbono supercrítico

Debido a las nuevas leyes que cuidan el medio ambiente de manera más estricta, las nuevas demandas del mercado de alimentos y los inconvenientes que ofrecen los métodos anteriormente mencionados, surge un método relativamente nuevo, la extracción mediante fluidos supercríticos donde se aprovecha la capacidad de los disolventes en modificar sus características

durante el proceso de extracción, y de manera selectiva separan los analitos deseados y los extrae en mayor proporción.

Los fluidos supercríticos se caracterizan por su alta capacidad de difusividad y baja viscosidad y tensión superficial. El disolvente universal más utilizado es el dióxido de carbono supercrítico, el cual por encima de su punto crítico (72,85 atm de presión y 31°C de temperatura), se difunde como un gas y a su vez, disuelve líquidos fácilmente. Se puede extraer mediante mecanismos químicos del medio ambiente y luego de emplearse en la extracción, también se puede recuperar. Por lo que este método se le puede considerar económico, además de caracterizarse por no contaminar, es inocuo, no tóxico y no inflamable. En este tipo de extracción, se emplean bajas temperaturas evitando la degradación térmica de los componentes y el espacio donde ocurre la extracción es no oxidante (previene oxidación de compuestos). Otra ventaja, es que controlando la presión en la extracción, el dióxido de carbono supercrítico tiene la capacidad de disolver los aceites y los arrastra hasta el contenedor receptor donde luego se evapora como gas, y lo suelta permitiendo que se conserven todas sus propiedades intactas, como concentración de antioxidantes, olor, sabor, color, pureza, entre otros. (Natolino & Da Porto, 2019).

Silva et al., (2019) experimentó que con la extracción con dióxido de carbono y expeller se obtienen mayores porcentajes de isómeros de ácidos linolénicos conjugados (CLnA), mientras que la extracción química con alcohol logró obtener mayor cantidad de fenoles, tocoferoles, fitosteroles, capacidad antioxidante y estabilidad oxidativa. Por lo que se entiende, que el mecanismo de extracción con CO₂ supercrítico es altamente selectivo y fluye fácilmente en el lecho de extracción por su alta difusividad y capacidad de solvatación. Pero si a la extracción supercrítica, se le adiciona un co-solvente como el etanol, podrá extraer también componentes polares como fosfolípidos y pigmentos, produciendo aceites de especialidad con elementos bioactivos que le den más valor agregado.

Sovová, (2017) recomienda el método de extracción con CO₂ supercrítico porque permite obtener compuestos bioactivos en un proceso semicontinuo que aprovecha el poder disolvente del dióxido de carbono presurizado que con la combinación de temperatura y presión adecuada, se extraen fácilmente los analitos objetivo. El proceso de extracción empieza colocando el material vegetal molido y seco en un recipiente a presión por donde el dióxido de carbono pasa disolviendo los compuestos de interés. Luego, el extracto se separa del disolvente en otro recipiente precipitado de la solución por la variación de presión y temperatura. El dióxido de carbono restante es reciclado y pasa al extractor nuevamente.

Las empresas industriales procuran optimizar sus procesos para lograr mejores rendimientos, pero la extracción con dióxido de carbono supercrítico no sigue un modelo matemático establecido. Y para cada caso específico, se requerirán pruebas para describir su comportamiento. Sin embargo, se pueden destacar tres modelos para explicar la extracción cinética supercrítica: modelo empírico, modelo simplificado y modelo integral fenomenológico.

El modelo empírico, básicamente crea fórmulas matemáticas simples que brindan sólo una idea básica de lo que ocurre durante el proceso pero no dan mayor explicación y detalle. Los modelos simplificados permiten comprender las limitaciones durante el proceso de extracción, por lo que es más rápido la toma de soluciones. Y finalmente, el modelo integral fenomenológico considera tres modelos adicionalmente: modelo de célula rota e intacta (por sus siglas en inglés Broken and Intact cell - BIC), modelo de núcleo de contracción (shrinking core - SC) y la combinación de BIC y núcleo de contracción (SCM-BIC). De los cuales, el más aplicado es el BIC, donde las muestras han pasado previamente por un tratamiento de molienda y algunas células aún están intactas y otras molidas.

Durante el proceso de extracción, dependiendo de los diferentes parámetros de temperatura, presión, tamaño de partícula, humedad de partículas, etc. La tasa de transferencia de masa puede llegar a disminuir por el aumento de la resistencia a la transferencia de masa, lo que usualmente, ocurre en las extracciones de aceite de semillas molidas. Al principio del proceso, la tasa de extracción es rápida y fácil, ya que también se aprovecha que las células al estar molidas y reducidas de tamaño, facilitan la salida del aceite de las paredes celulares en su superficie, pero después de transcurrido un tiempo, la extracción se va volviendo cada vez más lenta, dando un menor rendimiento de aceite ya que el disolvente tiene que empezar a extraer aceite de las células más profundas o intactas.

Huang et al., (2012) señaló que el modelo BIC se puede aplicar cuando el soluto se encuentra en la superficie de las partículas o en las células partidas provenientes de la molienda previa, de manera que el fluido supercrítico lo puede extraer más rápido a través de difusión y convección en el solvente; y es más difícil y lenta la extracción del soluto en las partículas intactas ya que hay mayor resistencia a la transferencia de masa.

La velocidad de extracción del soluto más asequible se establece según la resistencia a la película del disolvente del fluido supercrítico alrededor de la partícula y la velocidad de transferencia de masa del soluto menos asequible se establece por la parte sólida dentro de las partículas intactas.

(Natolino & Da Porto, 2019) Durante el proceso de extracción y según el modelo de célula rota e intacta (BIC), las curvas de extracción cinética presentan tres etapas: primero, un periodo de tasa de extracción constante (Constant Extraction Rate). Segundo, un periodo de tasa de extracción decreciente (Falling Extraction Rate) y tercero, un periodo de difusión controlada (Diffusion Controlled).

Huang et al., (2012) En el periodo de extracción constante, la capa externa de las partículas disponen en mayor cantidad del soluto de fácil acceso al disolvente, y la extracción se realiza de manera rápida. Pero al terminarse esta etapa, las partículas pierden por completo su soluto de fácil acceso, y se quedan con partículas que contienen soluto de difícil acceso y pueden ser parcialmente extraídos.

En el periodo de extracción decreciente, el soluto en las células intactas se comienza a extraer, la tasa de extracción decrece y es más lento.

Finalmente, en el periodo de difusión controlada, se comienza a extraer lentamente el soluto de difícil acceso de las células intactas.

(Natolino & Da Porto, 2019) También señaló que se deben realizar varias pruebas experimentales para analizar la solubilidad del soluto en los fluidos supercríticos, el cual se considera una de las propiedades termofísicas con más influencia durante la extracción ya que determina la cantidad de soluto que puede ser disuelto por el solvente. Asimismo, la solubilidad depende de la presión o la temperatura durante la extracción debido a que puede modificar la densidad del disolvente o la presión de vapor del soluto creando efectos indeseados.

2.3.5 Mediciones de color

Las mediciones de color en la industria alimentaria son esenciales ya que se consideran parámetros de calidad. Por ello, se han desarrollado muchas técnicas empleando colorímetros, espectrofotómetros, cartas de color, etc. Sin embargo, nuevas alternativas para medir color es mediante la visión digital que genera imágenes mediante cámaras digitales y son procesadas con ayuda de un software especial para interpretar la información. Este método no es invasivo y pueden ser automatizado dentro de la misma línea de proceso en planta, que

puede ayudar a tomar decisiones más rápidas y prácticas (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014)

En la investigación de Brosnan & Sun, (2004) también consideraron que estas nuevas tecnologías mediante cámaras digitales presentan mayor potencial para clasificar múltiples matrices, desde frutas o verduras, carnes, pescados, comidas preparadas, quesos, panes, granos, entre otros. Y decidir su rechazo o aprobación a tiempo real.

Vásquez, (2015) expuso que existen errores menores de transformación de coordenadas RGB a las coordenadas del sistema CIEL*a*b* obtenidas desde imágenes digitales y usando el software ImageJ en muestras de pasta de concentrados de tomate.

2.3.6 Dienos y trienos conjugados

Shahiri et al., (2017) Como producto de la oxidación de las grasas y aceites, se forman primero los dienos (oxidación primaria) y luego los trienos (oxidación secundaria) conjugados. Durante la oxidación primaria se encuentran los hidroperóxidos, mientras que en la oxidación secundaria, los aldehídos y cetonas. Y para evaluar su calidad en términos de pureza se emplea la técnica espectrofotométrica denominada coeficientes de extinción específicos de UV, en la cual se calculan los valores de K_{232} (oxidación primaria) y K_{270} (oxidación secundaria), los que a su vez están relacionados con los picos de sus absorbancias respectivas a 232 y 270. Valores bajos de absorción es sinónimo de un aceite de alta calidad, y por el contrario, valores altos comprueban que los aceites pueden estar adulterados o han sido más refinados. Es muy empleado debido a que es un método sencillo y rápido, sin embargo, en algunas ocasiones interfieren el contenido de carotenoides que se absorben en la misma región UV. Por lo que la Unión Europea ha establecido valores máximos permitidos, por ejemplo, el aceite de oliva extraído se clasifica en tres categorías según los

valores de K_{232} y K_{270} respectivamente: aceite de oliva extra virgen ($K_{232} \leq 2.4$ y $K_{270} \leq 0.20$), aceite de oliva virgen ($K_{232} \leq 2.5$ y $K_{270} \leq 0.25$) y aceite de oliva ($K_{232} \leq 3.3$ y $K_{270} \leq 1.0$)

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 Lugar de ejecución

Las actividades durante la investigación se realizaron en los laboratorios de la facultad de ingeniería y arquitectura de la universidad San Martín de Porres (Laboratorio de Procesos y laboratorio de química analítica), laboratorio de fluidos supercríticos del Instituto Tecnológico de la Producción, laboratorio de análisis instrumental del IMARPE y laboratorio de química de NSF INASSA S.A.C.

3.2 Materia prima

Las semillas de granada (*Punica granatum* L. Var. Smith) fueron donadas por la empresa Duna Corp S.A. provenientes del distrito de Sayán, provincia de Huaura, departamento de Lima, Perú.

3.2.1 Tratamiento de la muestra

Se recibieron las semillas congeladas (-18°C) procedentes del procesamiento de jugo de granada en bolsas de polietileno selladas. Se descongelaron, lavaron y deshidrataron hasta <7% humedad.

3.2.2 Diseño experimental

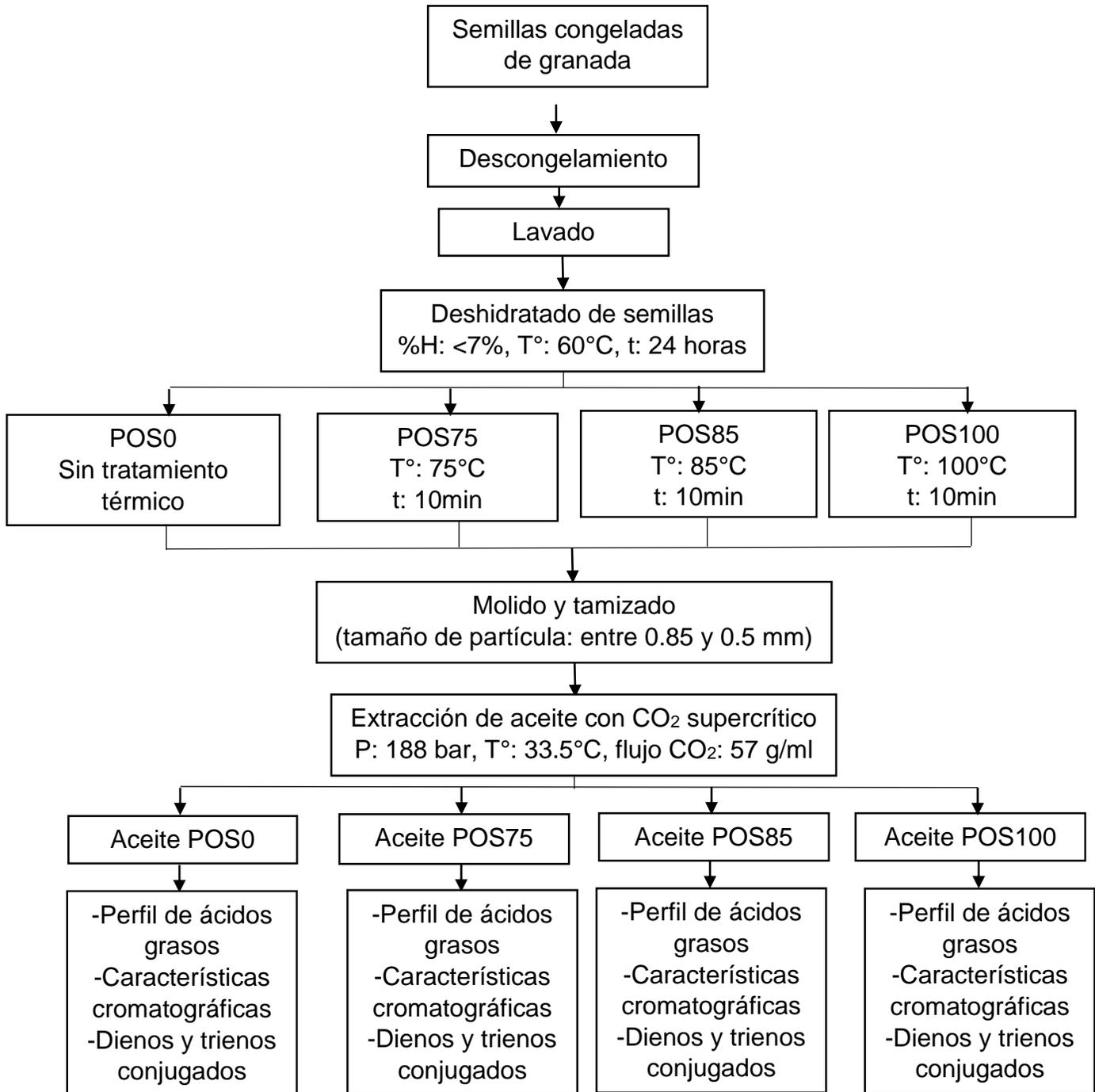


Figura 2. Diseño experimental

Elaboración: La autora

3.3 Reactivos, materiales y equipos

- Dióxido de carbono 99.8%, LINDE
- Isooctano grado HPLC, BIOLAB REAGENT
- Papel de filtro 9 cm de diámetro, AHLSTROM
- Cartulina negra
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Celda de cuarzo de 1 cm
- Fiola de 10 ml
- Pesa aceite
- Deshidratadora de cabina horizontal automatizada, USMP – FIA
- Campana extractora, LABCONCO 9902400
- Balanza infrarrojo, OHAUS MB35
- Balanza analítica, SARTORIUS CPA-224S
- Molino de martillos, ELECTRIC MOTOR MS 802-4
- Estufa eléctrica, MEMMERT UNE 400
- Serie de tamices, RICELI EQUIPOS ASTM E-11
- Tamizador eléctrico, RICELI EQUIPOS AT001
- Extractor multisolvente, TOP INDUSTRIE 2802.0000
- Espectrofotómetro, THERMO SCIENTIFIC GENESIS 10s UV-VIS
- Cromatógrafo de gases, VARIAN CP-3800
- Columna capilar, RESTEK 30 x 0.25 x 0.25
- Centrífuga, EPPENDOR 5424
- Selladora, YATONG PFS-400
- Cámara fotográfica, CANON EOS Rebel T6
- Foco LED, PHILIPS 6500 K

3.4 Método de análisis

3.4.1 Extracción de aceite de semilla de granada

Previamente a la extracción del POS, se emplearon los siguientes métodos para la caracterización de las semillas de granada secas.

Carbohidratos: Determinación por cálculo (Carbohidratos = 100 – valor de cenizas + fibra, grasa, proteínas, humedad).

Cenizas: Según AOAC 942.05, online, 20th Edition 2016 Ash of Animal Feed. Se pesó 2 g de muestra, se calcinó y se colocó en mufla a 600°C por 2 horas.

Fibra: Según AOCS Official Method Ba 6-84, 7th. Edition 2017 Crude Fiber in oilseed by-products. Se pesó 2 g de muestra y se desengrasó con éter. Se colocó el residuo en un matraz de 500 ml, donde se añadió 200 ml ácido sulfúrico diluido, se filtró con lana de vidrio y se repitió con 200 ml de soda diluida y se filtró a través de un gooch y se pesó. Se colocó en una estufa y luego en mufla. Finalmente, se pesó el peso final.

Grasa: Según AOAC 920.39, C, Online, 20th. Edition 2016 Fat (Crude) or Ether Extract in Animal Feed. Se pesó 2 g de muestra y se colocó en el equipo soxhlet, en un balón tarado con hexano por 5 horas, al final se recuperó el solvente y se pesó.

Humedad y materia volátil: Según NTP-ISO 6496:2011 (revisada el 2016) 2011 ALIMENTOS PARA ANIMALES. Determinación de contenido de humedad y

materia volátil. Se pesó 5 g de muestra sobre una placa y se colocó en una estufa a 103°C por 4 horas.

Proteína: Según NTP ISO 5983:2002 (revisada el 2013) 2002 ALIMENTOS PARA ANIMALES. Determinación del contenido de nitrógeno y cálculos del contenido de proteína cruda. Método Kjeldahl. Se pesó 1 g de muestra que se digirió en un balón con sus respectivo catalizador, se añadió ácido sulfúrico concentrado, luego se enfrió y se destiló en presencia de ácido sulfúrico 0.1 N, y finalmente, se tituló con hidróxido 0.1N.

Luego, fueron sometidas a los diferentes tratamientos térmicos por separado: POS0 (sin tratamiento térmico), POS75 (75°C por 10 minutos), POS85 (85°C por 10 minutos), POS100 (100°C por 10 minutos). Y posteriormente, se molieron con un molino de martillos hasta obtener un tamaño de partícula entre 0.85 mm y 0.5 mm. Para la extracción de POS se empleó CO₂ supercrítico como disolvente y considerando los parámetros de presión 188 bar, Temperatura 33.5°C, flujo de CO₂ 57 g/ml.

3.4.2 Perfil de ácidos grasos

Se determinó perfil de ácidos grasos del aceite obtenido de la semilla de granada, empleando el método descrito por el Instituto del Mar Peruano basado en el método de Ichihara y Fukubayashi, (2009) que emplea un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de flama (GC-FID). A partir de 1 mg de muestra de aceite y 0.1 mg de estándar interno C23:0 tricosenoato de metilo, se le añadió 0.2 mL de tolueno, 1.5 mL de metanol y 0.3 mL de la solución (HCl: metanol 1:4.3) y se mantuvo a 45°C por 14 horas para la derivatización.

Posteriormente, se separaron los metilesteres producidos con 1.5 mL de hexano y 1 mL de agua que se inyectaron en el equipo Varian CP-3800 (Alemania) de manera splitless (0.5 minutos) con volumen de inyección de 1 μ L y una columna capilar FAMEWAX® WCOT de sílice fundida marca Restek (30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno, 0.25 μ m de espesor de película), donde el gas de arrastre fue helio a un flujo de 1 mL/min, la temperatura del horno se fijó a 120°C por 1 minuto y se llegó a 160°C, se mantuvo a 160°C por 1 minuto y se incrementó nuevamente a 4°C/min hasta 240°C y finalmente se mantuvo a 240°C por 7 minutos. La temperatura del inyector y detector fueron 250°C y 260°C respectivamente. El tiempo total del análisis fue de 30.33 minutos.

Se realizó el análisis de ácidos grasos por duplicado y se identificaron comparándolos con los tiempos de retención de los estándares y cuantificados según las áreas relativas según su patrón interno C23:0. Los resultados se expresaron como mg de ácido graso por gramo de muestra y en porcentaje.

3.4.3 Características cromáticas

Las muestras de aceite obtenidas se centrifugaron por 20 minutos a 18407 rcf y rápidamente se colocaron sobre un fondo de color negro, a una distancia de 12 cm por debajo de la fuente de luz fría de 6500 K que se fotografiaron en un ángulo de 90° con una cámara profesional. Los resultados fueron procesados directamente del software ImageJ que convierte las coordenadas rojo, verde y azul en las coordenadas cromáticas del sistema CIEL*a*b*.

Los valores de croma y tono fueron calculados empleando las fórmulas (1) y (2), respectivamente:

$$Croma (C *) = \sqrt{(a *)^2 + (b *)^2} \quad (1)$$

$$Tono (h *) = \arctan \frac{b *}{a *} \quad (2)$$

Se consideraron 08 puntos dentro de la misma imagen que se promediaron y se calculó la desviación estándar.

3.4.4 Dienes y trienos conjugados

El análisis de dienos y trienos conjugados se realizó mediante el método de la AOCS Ch 5-91 (2008). Se encendió el espectrofotómetro y se contabilizó 20 minutos para que la lámpara interna esté en correcto funcionamiento. Las muestras de aceite fueron centrifugadas por 20 minutos a 18407 rcf, y se pesó 0.1 gramo de muestra en el pesa aceite que luego se colocó dentro de una fiola de 10 ml y se enrazó con el reactivo isooctano (2,2, 4-trimetilpentano) obteniendo una solución totalmente transparente y homogénea. Caso contrario, cuando las soluciones no son transparentes, se debe repetir este paso hasta que la solución haciéndola más diluida según sea el caso para que no presenten turbiedad. Se realizó un blanco y las absorbancias se colocaron en cero configurando el espectrofotómetro a las longitudes de onda: 232 nm, 266 nm, 270 nm y 274 nm.

Luego, se midió la extinción a 232 nm y 270 nm por duplicado, mediante la siguiente fórmula (3):

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{C \times e} \quad (3)$$

Donde:

$E\lambda$: Extinción medida en el espectrofotómetro a dicha longitud de onda

C: Concentración de la disolución de aceite (g/100 ml)

e: Paso óptico de la cubeta (1 cm)

3.5 Análisis estadístico

Se desarrolló empleando el método ANOVA para medir la variabilidad de las medias que resultaron de los diferentes tratamientos térmicos. Debido a que se encontraron diferencias significativas, se realizó el test estadístico de Fisher, con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

CAPÍTULO IV RESULTADOS

4.1 Extracción de aceite de semilla de granada

En la tabla 5, se muestran los resultados obtenidos de los análisis de carbohidratos, cenizas, fibra, grasa, humedad y materia volátil y proteína que se realizaron a la semilla de granada antes de someterlas a los diferentes tratamientos térmicos.

Tabla 5. Análisis proximal de la semilla de granada antes del tratamiento térmico

Análisis	Resultado
Carbohidratos	22.47%
Cenizas	2.1%
Fibra	25.32%
Grasa	23.71%
Humedad y materia volátil	5.0%
Proteína	21.40%

Elaboración: La autora

El rendimiento, en los diferentes tratamientos, fueron de 7.63% (POS0), 8.10% (POS75), 7.30% (POS85) y 6.95% (POS100), los cuales se presentan en la tabla 6. Se observó que al incrementar el tiempo de extracción, el rendimiento desde los 0 hasta los 150 minutos es rápidamente ascendente; sin embargo, posteriormente no se muestra una diferencia mayor a 1 dígito, en general, y es casi constante por lo que se paró el proceso de extracción.

Tabla 6. Rendimientos según tratamientos

Tiempo (min)	POS0		POS75		POS85		POS100	
	Peso aceite (g)	Rendimiento (%)						
0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
30	2.67	2.00	2.38	1.80	1.56	1.17	1.41	1.06
60	5.13	3.48	4.04	3.06	4.07	3.06	3.59	2.71
90	6.47	4.84	6.21	4.70	5.7	4.29	5.6	4.23
120	7.77	5.82	8.1	6.13	7.15	5.38	6.76	5.11
150	9.81	7.34	9.75	7.38	8.76	5.69	8.12	6.13
180	10.2	7.63	10.7	8.10	9.70	7.30	9.2	6.95

Elaboración: La autora

4.2 Perfil de ácidos grasos

Los resultados de la determinación del perfil de ácidos grasos del aceite extraído de las semillas de granada (*Punica granatum* L. Var. Smith) se presentan en la tabla 7, con diferencias significativa ($p > 0.05$). No se observaron diferencias cualitativas, pero sí cuantitativas entre los POS extraídos mediante los diferentes tratamientos térmicos.

Se encontraron los siguientes ácidos grasos según su porcentaje en el orden de mayor a menor, respectivamente: Ácido puníco (C18:3 Δ 9c,11t,13c) > Ácido linoleico (C 18:2n-6) > Ácido catálpico (C18:3 Δ 9t,11t,13c) > Ácido β -eleosteárico (C18:3 Δ 9t,11t,13t) > Ácido oleico (C 18:1n-9) > Ácido palmítico (C 16:0) > Ácido esteárico (C 18:0) en todos los tratamientos.

Tabla 7 . Resultados de perfil de ácidos grasos en porcentajes (%)

Ácido graso	Abreviación taquigráfica	Tratamientos			
		POS0	POS75	POS85	POS100
Palmítico	C 16:0	6.18 ^b	7.16 ^a	5.87 ^c	5.59 ^d
Esteárico	C 18:0	3.02 ^b	3.13 ^a	3.03 ^b	2.91 ^c
Oleico	C 18:1n-9	8.43 ^c	8.83 ^a	8.73 ^b	8.23 ^d
Linoleico	C 18:2n-6	13.45 ^b	15.27 ^a	13.17 ^c	12.70 ^d
Puníco	C18:3 Δ 9c,11t,13c	44.72 ^b	41.23 ^c	45.99 ^b	48.37 ^a
Catálpico	C18:3 Δ 9t,11t,13c	13.05 ^{ab}	13.13 ^a	12.48 ^{bc}	11.96 ^c
β -eleosteárico	C18:3 Δ 9t,11t,13t	11.17 ^a	11.28 ^a	10.76 ^{ab}	10.26 ^b
SFA		9.2 ^b	10.29 ^a	8.9 ^c	8.5 ^c
MUFA		8.43 ^c	8.83 ^a	8.73 ^b	8.23 ^d
PUFA		82.39 ^b	80.91 ^a	82.4 ^c	83.29 ^d

Los diferentes superíndices en la misma línea indican valor significativamente diferente ($p < 0.05$)

Elaboración: La autora

En la presente investigación el tiempo de retención del ácido punícico fue de 19.89 minutos en todas las muestras analizadas. Se muestran en la tabla 8, los tiempos de retención de los ácidos grasos encontrados en la presente investigación.

Tabla 8. Tiempos de retención de los ácidos grasos analizados en POS

Ácido graso	Tiempo de retención (min)
Palmítico	11.37
Esteárico	14.57
Oleico	14.86
Linoleico	15.57
Punícico	19.89
Catálpico	20.13
β -eleosteárico	20.45

Elaboración: La autora

Se presenta en la figura 3, el cromatograma del perfil de ácidos grasos del aceite de semilla de granada que presentó el mismo comportamiento en todos los tratamientos: POS0, POS75, POS85 y POS100.

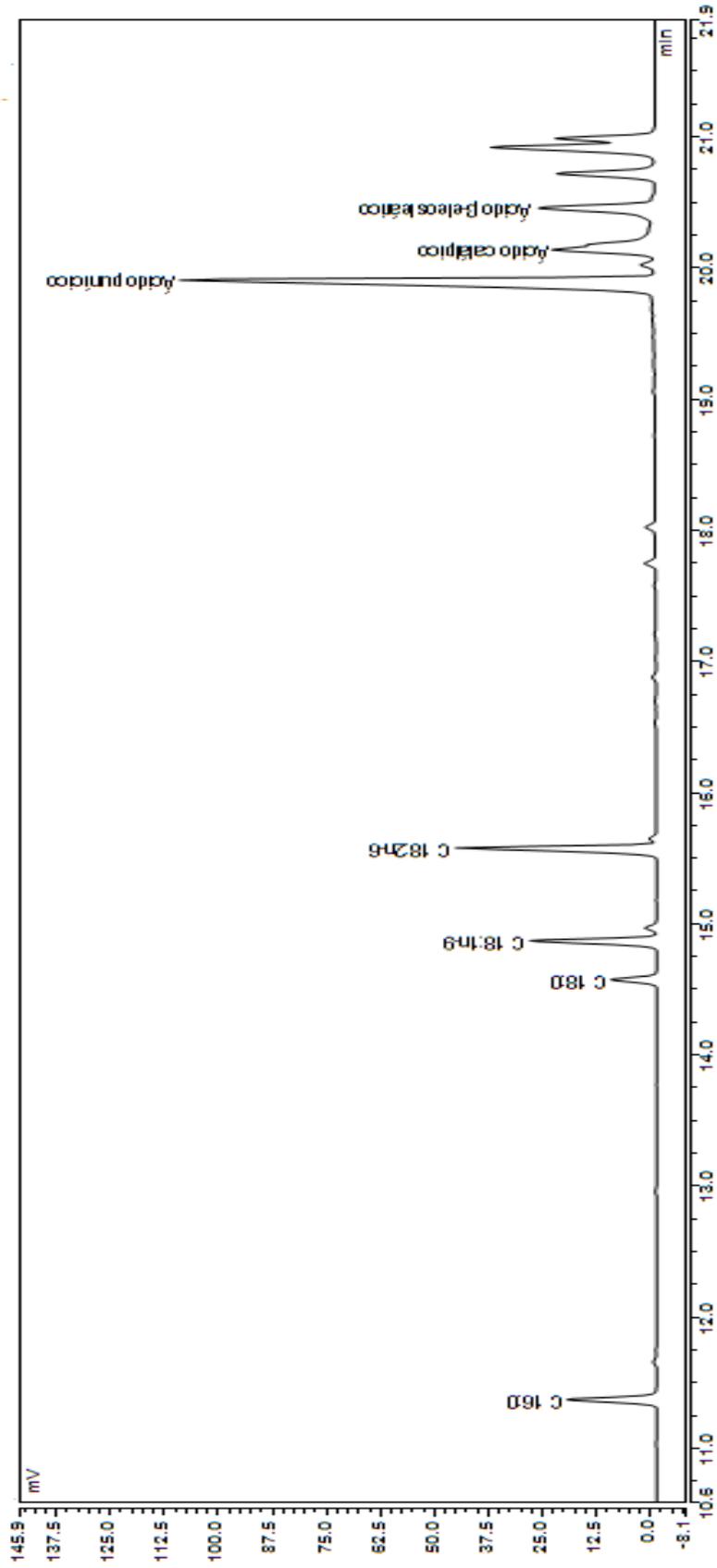


Figura 3. Cromatograma del perfil de ácidos grasos de POS0, POS75, POS85, POS100

Elaboración: La autora

4.3 Características cromáticas

Los aceites obtenidos mediante la extracción supercrítica con CO₂ se muestran en la figura 4, donde se observa un color característico amarillo claro en todas las muestras, sin embargo dependiendo de los tratamientos existe una diferencia significativa ($p < 0.05$).

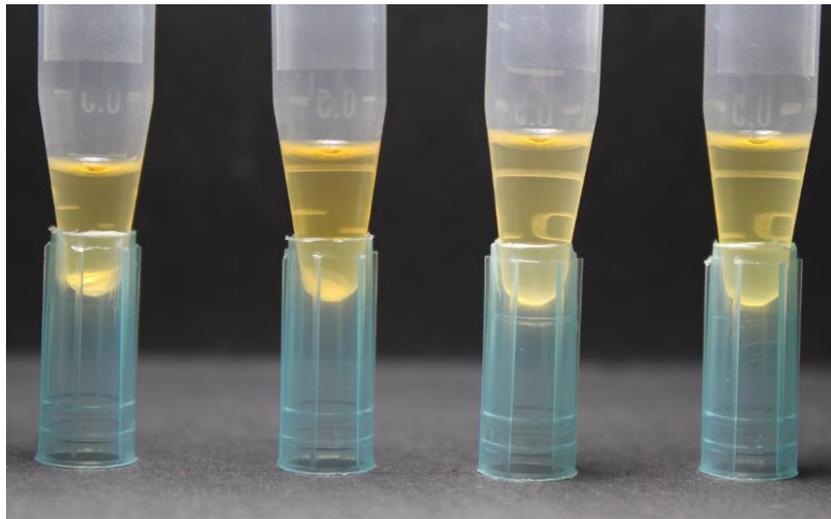


Figura 4. Aceites extraídos POS0, POS75, POS85, POS100

Elaboración: La autora

En la tabla 9, se puede observar que a mayor temperatura del tratamiento, el valor de L* aumenta, por lo que las muestras tienden a aclarar su tonalidad de 46.75 hasta 50.75 ($p < 0.05$) con el tratamiento a 100°C. Todos los valores de a* también fueron negativos entre -0.67 a -4.23 ($p < 0.05$) por lo que se evidencia que hay mayores componentes de color verde al aumentar la temperatura del tratamiento. La coloración amarilla se puede confirmar con los valores de b* que varían de 27.90 a 34.07 ($p < 0.05$) ya que es positivo y se representa en el diagrama del sistema de color cielab con el color amarillo. Los valores de C* (croma) presentan una mayor saturación a medida que se aumenta la temperatura desde 27.92 a 34.10 ($p < 0.05$) y h° (tono) también presenta una

diferencia significativa con valores que oscilan entre 91.36 hasta 97.73 ($p < 0.05$).

Tabla 9. Resultados de color del aceite extraído según el tratamiento térmico

Parámetro	Tratamientos			
	POS0	POS75	POS85	POS100
L*	46.75 ^d	48.14 ^c	55.78 ^a	50.75 ^b
a*	-0.67 ^a	-1.07 ^a	-2.72 ^b	-4.23 ^c
b*	27.90 ^c	34.07 ^a	27.98 ^c	31.19 ^b
C*	27.92 ^c	34.10 ^a	28.12 ^c	31.49 ^b
H°	91.36 ^c	91.77 ^c	95.51 ^b	97.73 ^a

Los diferentes superíndices en la misma línea indican valor significativamente diferente ($p < 0.05$)

Elaboración: La autora

4.4 Dienos y trienos conjugados

Se presentan los resultados (tabla 10) de los dienos y trienos de los POS obtenidos a través de diferentes tratamientos y no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, el valor de los dienos y los trienos aumentan y posteriormente disminuyen mientras que la temperatura de los tratamientos aumenta. El valor de los dienos oscila entre 3.90, aumenta a 3.93 y luego disminuye a 3.84. Mientras que el valor de los trienos de 3.50, aumenta a 3.52, y disminuye de 3.46 a finalmente 3.45.

Tabla 10. Resultados de dienos y trienos del aceite extraído según el tratamiento térmico

Parámetro	Tratamientos			
	POS0	POS75	POS85	POS100
Dienos	3.90 ^a	3.93 ^a	3.84 ^a	3.84 ^a
Trienos	3.50 ^a	3.52 ^a	3.46 ^a	3.45 ^a

Los diferentes superíndices en la misma línea indican valor significativamente diferente ($p < 0.05$)

Elaboración: La autora

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

5.1 Extracción de aceite de semilla de granada

Como se observan los resultados en la tabla 6, el método de extracción de POS mediante dióxido de carbono supercrítico con tratamiento térmico en las semillas de granada de variedad Smith, no fue el más óptimo debido a su bajo rendimiento en la extracción.

Sin embargo, Verardo et al., (2014) reportó que en algunas semillas de granada de diferentes partes del mundo como Israel, España, Túnez, Irán, Turquía, e incluso clones de variedades no comerciales, obtuvieron entre 7.9-16% de aceite extraído mediante solventes químicos, considerando que ellos no realizaron un análisis previo del contenido de grasa total en la semilla. Por lo que se puede considerar sus resultados de rendimiento similares a los obtenidos en esta investigación entre 6.95% y 8.10%. Además, encontró que entre el 56-86% de fosfolípidos totales que contiene, el mayor componente fue la fosfatidiletanolamina, principal fosfolípido, que debido a su característica anfipática, podría actuar como agente emulsionante para que con la adición de un co-solvente (agua) en la extracción supercrítica, se mezcle más fácilmente con el aceite y por arrastre mediante el dióxido de carbono se extraiga más material lipídico de la semilla aumentando el rendimiento.

Los resultados de Dhia & Sawsan, (2016) en granadas frescas provenientes de Irak, que luego de procesar su jugo, secó las semillas en un horno a 40°C por 24 horas, molió y luego extrajo el aceite mediante soxhlet con

n-hexano, dieron un rendimiento del 12.68%. De igual manera, Fernandes et al., (2015) comparó nueve variedades españolas de granada que mediante la extracción por soxhlet, obtuvo rendimientos de POS en las muestras Katirbasi (13.70%), CG8 (12.04%), Wonderful 1 (8.60%), Wonderful 2 (6.85%), Parfianka (5.97%), Cis 127 (5.94%), White (5.42%), Mollar de Elche (5.33%) y Valenciana (4.44%). Y aunque ambos experimentos fueron mediante extracciones químicas, que tienen por lo general, mayor capacidad extractante, mostraron similar porcentaje de rendimiento comparados con los obtenidos en esta investigación, precisando que los principales factores no son en este caso los disolventes, ni el método de extracción; sino factores como variedad de granada, origen, clima, periodo de cosecha, suelo, entre otros; incluso se puede pensar que la variedad Smith puede provenir de alguna propagación del cultivo desde los países mencionados.

Durante la extracción supercrítica, tanto Liu et al., (2012) como Fiori, (2010) mencionan que la presión a 45 MPa, y entre 200 y 800 bar, respectivamente, tienen mayor efecto positivo en el rendimiento de extracción de aceite empleando CO₂ supercrítico, ya que a su vez aumenta la densidad del CO₂ y la solubilidad del aceite en el disolvente. Natolino & Da Porto, (2019) reportó que la presión óptima en su extracción mediante CO₂ supercrítico fue 320 bar de presión, lo que le permitió obtener valor máximo de rendimiento de 0.18 g aceite/g sólido insoluble (tabla 11) de calidad con buena actividad antioxidante y con más concentración de ácido punícico. Por lo que, de esta observación, se deduce que la presión (188 bar) empleada en esta investigación fue insuficiente para que la extracción del aceite sea mayor. Sin embargo, Eikani et al., (2012) obtuvo un rendimiento de 22.18% de aceite de semilla de granada empleando hexano sobrecalentado como fluido supercrítico, 0.25 mm de partícula, presión de 20 bar, partiendo de 3 gramos de muestra. Por lo que también los parámetros de diámetro de partícula y muestra inicial hacen diferencias en el rendimiento. En la figura 2 del diseño experimental se observa que se consideró moler las semillas con un tamaño de partícula entre 0.5 y 0.85 mm de diámetro y partiendo de 133 g de muestra para la extracción, discutiendo principalmente que al contener

mayor cantidad de muestra en el contenedor de extracción con tamaños de partículas más grandes, no quedo mucho espacio libre para que el disolvente logre penetrar hasta lo más profundo de las células y pueda extraer más cantidad de aceite.

En la investigación de Ahangari & Sargolzaei, (2012) muestran que se obtuvieron rendimientos (13.06% p/p) empleando dióxido de carbono supercrítico como disolvente, y concuerdan con otras investigaciones que la presión tiene un efecto positivo mayor en el rendimiento de extracción al emplear solamente dióxido de carbono supercrítico como disolvente, ya que aumenta la densidad del CO₂ y su capacidad de disolver lípidos. Sin embargo, al emplear otros tipos de disolventes como propano subcritico, se recomiendan considerar parámetros de presión menor, tiempos de extracción menor y temperaturas mayores para aumentar el rendimiento de extracción ya que con este tipo de solvente, su densidad y su capacidad de disolver lípidos se ve más afectada por los cambios de temperatura, que de presión. Por lo que se entiende que al emplear sólo el CO₂ como disolvente, se deben considerar mayores presiones durante la extracción supercrítica.

Es así, como en la figura 8, se puede observar que en las curvas de cinetica de rendimiento de extracción, la primera parte de la curva demostró que el aceite es fácilmente extraído por el fluido supercrítico a una constante de extracción, mientras que en la segunda parte de la curva, la extracción perdió rapidez, la curva se hace menos empinada y la diferencia de peso de aceite extraído fue disminuyendo cada 30 minutos, esto debido a que el aceite de la superficie de la semilla se va agotando y el solvente tiene que comenzar a extraer lípidos restantes en la semilla que son más profundas. Y en la última parte de la curva, esta puede comenzar a disminuir ya que no hay suficiente aceite disponible, pero en este caso, se paró la extracción y no se observa la curva, porque no es rentable y ya en la segunda etapa el peso de aceite extraído era menor a 1 dígito de diferencia.

En la investigación de Khadivi et al., (2020) se determinaron que existen diferencias morfológicas y pomológicas entre las semillas de granada provenientes del norte de Irán. Las clasificó en tres grupos según la dureza de la parte leñosa. La mayoría de las semillas eran duras (142 unidades aprobadas), otras eran semi-suaves (48 unidades aprobadas) y, otras suaves (14 unidades aprobadas). Y para el caso de la variedad Smith en esta investigación, se podría incluir dentro de la clasificación de dura, ya que como se observa en la figura 5, esta no pierde su forma aún luego del tratamiento térmico y molienda.

Por lo que se puede asumir que la parte leñosa al ser sometida a la molienda y a los diferentes tratamientos térmicos perdió gradualmente de menor a mayor parte de su humedad, volviéndose más porosa y seca, lo que también hace que disminuya la resistencia a la transferencia de masa del soluto entre las estructuras celulares de la semilla aumentando la extracción del aceite al principio. Es por ello, que se puede observar que en los primeros minutos de la extracción, existe una mejor extracción; sin embargo, conforme aumenta el tiempo de extracción, el aceite se va agotando dentro de sus estructuras vegetales, y cada vez se hace más difícil extraerlo, haciendo que se quede en las paredes celulares de la semilla, por ende, en los últimos minutos se observa que la extracción se hace constante e incluso llega a disminuir. Pero para facilitar la extracción y debido a que el CO₂ es apolar, se piensa que sería recomendable el empleo de un disolvente orgánico polar, también llamados codisolventes, cosolventes, modificadores o segundo disolvente, el que podría ser agua, y según Román et al., (2016), por sus características polares, éste funcionaría como un protector de la parte leñosa de la semilla, sin que retenga parte del aceite que se está extrayendo y para que el CO₂ supercrítico pueda extraer por arrastre más fácilmente el aceite y se aumente el rendimiento de extracción. Adicionalmente, se considera que el aceite no extraído se quedó retenido en las semillas dentro del vaso extractor del equipo, ya que al comienzo como se puede observar el análisis de grasa total en las semillas fue de 23.71%.

5.2 Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos tiende a un ligero incremento con relación al aumento del tratamiento térmico, lo que podría suponerse que la extracción de aceite de semillas con CO₂ supercrítico puede ser selectiva para ciertos ácidos grasos como lo demuestran otros autores donde varían presión y temperatura resultando en mayor o menor porcentaje de ciertos ácidos grasos.

La investigación de Ceyhun-Sezgin & Artik, (2017) menciona que en el aceite de granada se encontró ácido palmítico (5.30±0.38%), ácido esteárico (2.78±0.51%), ácido oléico (12.34±2.88%), ácido linoléico (13.45±2.01%) y ácido púnicico (64.65±4.51%), los cuales también se presentaron en esta investigación. En otra investigación de Melo et al., (2014) indicó que los porcentajes que cada ácido graso puede variar según el lugar de procedencia. Sin embargo, el ácido púnicico siempre es el mayoritario (36.98% a 81.22%) en cualquiera de las variedades que analizo provenientes de India, China y Túnez, Turquía, USA y Brazil (tabla 13).

Topkafa, Kara & Sherazi (2015) presentaron un cromatograma (figura 6) similar al obtenido en esta investigación, empleando POS de origen turco y extraídas con prensado en frío, encontrando que el mayor componente del perfil de ácidos grasos es el ácido púnicico (76.57%), seguido del ácido catálpico 6.47% y β-eleosteárico 1.45% como los principales ácidos grasos conjugados CLnA presentes en las semillas de granada. Ambos métodos fueron realizados de manera similar, por lo que se pueden confirmar los resultados que se muestran en la figura 3.

En la figura 7, se muestra el cromatograma del perfil de ácidos grasos en la muestra de semilla de granada que según Aruna et al., (2018) principalmente el ácido púnicico presentó el tiempo de retención de 13.32 min. Asimismo, en la tabla 12, se muestra una comparación con los tiempos de retención del ácido púnicico de otras investigaciones apareciendo entre los 11 a 20 minutos, y no sólo en muestras de granada, sino también en muestras como el pepinillo del

diablo o las raíces de la planta de maní. El tiempo de retención obtenido en esta investigación para el ácido punícico fue de 19.89 minutos, por lo que está dentro del rango de tiempo consultado. Ceyhun-Sezgin & Artik, (2017) encontraron que el tiempo de retención para el estándar del ácido punícico fue 12.458 min. Y al analizar su muestra de aceite de semilla de granada, el tiempo de retención del ácido punícico fue 12.47 min, por lo que se demuestra que incluso empleando el kit estándar, la aparición del analito en el cromatograma puede variar ligeramente.

En una muestra de aceite de semilla de granada realizado por Elfalleh et al., (2011) encontraron adicionalmente ácido mirístico, ácido araquídico, ácido gadoléico, ácido α -eleosteárico y ácido lignocérico, debido principalmente a la variedad y a otros métodos de extracción y análisis. Así como en la investigación de Tian et al., (2013) también se reportó que varía la concentración de ácido punícico según el método de extracción con soxhlet (65.04%), fluido supercrítico (66.88%) y asistido con ultrasonido (67.85%). Siano et al., (2016) encontró mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), que ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) en el POS, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la tabla 7, donde los porcentajes de PUFAs también fueron los mayoritarios con valores entre 80.91 a 83.29% en todos los POS y sus tratamientos.

Debido al aumento de la presión y temperatura durante la extracción con CO₂ supercrítico en la investigación de Liu et al., (2012) se notó un ligero incremento en la concentración de ácido punícico (60%), ácido araquídico y ácido gadoléico. Lo que da un indicio más que la extracción con CO₂ supercrítico es selectivo según los parámetros empleados en la extracción, y conociendo las propiedades de los solutos que deseamos extraer, se puede aumentar o disminuir la presión o temperatura en el proceso de extracción, que a su vez, aumentará o disminuirá la extracción del analito objetivo. Aunque en esta investigación no se realizaron más experimentos aumentando o disminuyendo la temperatura o presión durante la extracción, se sometieron las semillas a

tratamientos térmicos a diferentes temperaturas previamente, como mecanismo que ayude a una mayor dilatación de las células vegetales en las semillas y así obtener mayores rendimientos durante la extracción. Y a pesar del bajo rendimiento obtenido durante la extracción, en la tabla 6, se observa que las concentraciones de ácido punícico aumentaron ligeramente con el aumento de la temperatura de los tratamientos previos, por lo que corrobora la idea que la extracción con CO₂ supercrítica es adecuada para obtener un aceite de semilla de granada de mejor calidad y perfil de ácidos grasos con mayor concentración de ácido punícico como el principal componente (41.23 - 48.37%).

Otro factor a tener en cuenta que tiene mucho impacto en el resultado del perfil de los ácidos grasos, es la temperatura del tratamiento al que se sometieron las semillas, ya que lo expuesto por Ruge et al., (2012) y Verardo et al., (2014), los tratamientos térmicos causan una reducción de la actividad lipolítica de las enzimas presentes evitando que catalicen los triglicéridos a ácidos grasos libres y glicerol, pero mejorando la estabilidad del sabor y color. Este efecto, también depende mucho de la temperatura, tiempo y tipo de aire de secado. Ellos encontraron que para la harina de avena mediante el tostado con aire caliente (155°C por 20 minutos) fue más aceptable según su evaluación sensorial, sin embargo, su concentración de ácidos grasos aumentó conforme se incrementó el tiempo de almacenamiento debido al efecto del tratamiento térmico. Resultados similares se obtuvieron en la presente investigación del incremento de los ácidos grasos, aunque solo se empleó 10 minutos y menores temperaturas (75°C, 85°C y 100°C), este efecto se puede basar en que la transferencia de calor fue más difícil en llegar al centro de las semillas de granada ya que estas presentan una capa leñosa, gruesa y dura que protege al material lipídico, y además por el poco tiempo de secado y bajas temperaturas, que el efecto del tratamiento térmico no tuvo mucha incidencia en la inactivación de las lipasas, dejando que se hidrolicen más triacilgliceroles y aumentando su porcentaje.

5.3 Características cromáticas

En investigaciones previas, se ha demostrado que las características de calidad de los aceites extraídos son diferentes debido a múltiples factores como el tipo de extracción, los reactivos químicos empleados, el tiempo, la variedad de las semillas, lugar de procedencia, climas, e incluso la manera en que fueron analizados. Y en esta investigación, se optó por nuevas, eficaces y novedosas tecnologías que nos permitan tener resultados confiables y rápidas. Es por ello, que para la toma de muestras del color, se procedió a tomar fotos digitales con una cámara profesional que mediante el software ImageJ, nos dieron las coordenadas en el sistema CIEL*a*b, y en la investigación de Vásquez, (2015) se menciona que las fotografías digitales que han sido analizadas con el software ImageJ, son un método práctico ya que se puede obtener resultados más rápidos dentro de la misma línea de proceso colocando cámaras fotográficas y con menos error de transformación de coordenadas de color RGB a CIEL*a*b*.

Las características cromáticas del POS de los distintos tratamientos POS75, POS85 y POS100 mostraron un ligero aumento en el valor de L* que fue mayor que la muestra de POS0, la cual fue la única muestra que no fue sometida a un tratamiento de calor, por lo que se asume que temperaturas a partir de los 75°C modifican la luminosidad en el aceite obtenido, degradando algunos componentes de color o potenciando su saturación y tono.

Según Khoddami et al., (2014), comparó las características cromáticas de tres diferentes variedades de POS provenientes de Irán y Turquía que fueron extraídas mediante prensa fría, según el sistema de color de Hunter. Mediante el software ImageJ, se convirtieron los valores respectivos al sistema de color CIEL*a*b, y se obtuvieron valores ligeramente diferentes, valor de L* (entre 67.35 y 82.19), a* (entre 4.54 y 20.44) y b* (entre 69.57 y 78.32). Mientras, que en esta investigación los valores fueron L* (entre 46.75 y 55.78), a* (entre -0.67 y -4.23) y b* (entre 27.90 y 34.07), por lo que se puede pensar que la variedad Smith de esta investigación, es más sensible a la descomposición de características

cromáticas debido a la intensidad de la temperatura del tratamiento, y existen más componentes verdosos que amarillos. Similar resultado los experimentó Ampem, (2017) que encontró diferencias cromáticas según las variedades (Wonderful, Acco, Herskovitz) y los solventes (hexano, éter de petróleo, acetona) empleados en las extracciones debido a sus características fisicoquímicas.

Y aunque la investigación de los POS de Keskin et al., (2017) también se estudiaron valores de L^* , a^* y b^* según los procesos de extracción (solvente y asistida con microondas y extracción con solvente en frío). Para ambos métodos comparados, sus valores de L^* variaron entre 56.03 y 58.91, valor de a^* entre -5.64 y -2.45, y valor de b^* entre 22.06 y 14.44; lo que comparando con lo obtenido en esta investigación con extracción mediante CO_2 supercrítico, el valor de L^* fue menor en 1.12%, para los valores de a^* fue menor en 1.65% y para valores de b^* fue mayor en 0.59%, dejando a entender que estos tipos de extracciones permiten obtener más compuestos como la clorofila o los carotenos dentro de las semillas de la granada.

5.4 Dienes y trienos conjugados

Los resultados obtenidos en esta investigación en la tabla 10, muestran que los valores de dienos y trienos conjugados forman un patrón de comportamiento que al inicio con el aumento de temperatura de los tratamientos, aumentan y posteriormente se mantiene constante o disminuye. Resultados similares también los experimentó (Zorrilla, 2015) investigando la influencia del tostado en semillas de *Plukenetia Huayllabambana*, notando que conforme la temperatura del tostado aumenta, el valor de los dienos se incrementan, pero con el tiempo se estabilizan y hasta disminuyen. Tal como Codony et al., (2010) explica este fenómeno debido al aumento de la velocidad de destrucción de los peróxidos.

En la investigación de Özyurt, (2019) los valores encontrados para el aceite de semilla de granada extraída con prensa en frío fueron 3.83 y 4.00, para K_{232} y K_{270} respectivamente. Y los valores de Amri et al., (2017) fueron para K_{232} y K_{270} 4.15 y 3.95 respectivamente en semillas de granada de la variedad Tounsi. Los cuales son ligeramente parecidos a los valores obtenidos (tabla 10); sin embargo, al compáralos con los valores de Dhia & Sawsan, (2016) de 2.154 y 1.456 para K_{232} y K_{270} en POS mediante extracción con n-hexano; se podría pensar que tienen mejor calidad y no se oxidan rápidamente. Pero los CLnA son susceptibles a degradarse y entre sus isómeros, el más estable presenta la estructura Trans-Trans-Trans, seguido de Cis-Trans-Trans y por último, Cis-Trans-Cis (Yang et al., 2009). Sin embargo, Yoshime et al., (2018) investigó que aunque el ácido puníco, tiene la estructura Cis-Trans-Cis, presentó mejor estabilidad oxidativa que el aceite de calabaza amarga, debido a su alto contenido de tocoferoles que son considerados los antioxidantes más importantes en los aceites. En la investigación de Yuan et al., (2014) mencionó que los aceites vegetales que contienen al ácido puníco, proveniente de la familia de los CLnA, ejercen mejor actividad antioxidante a concentraciones bajas debido a una mejor estabilidad oxidativa. Saha et al., (2012) también muestra en sus resultados que el poder antioxidante es mayor a menor concentración de los isómeros de ácidos linolénicos conjugados (CLnA). Estos al tener estructuras químicas diferentes a los otros ácidos grasos no conjugados, reaccionan más fácil y rápidamente al contacto con el oxígeno, por lo que a veces se les considera como pro-antioxidantes si su concentración es muy alta. Por lo que se asume en esta investigación, a parte del ácido puníco, los otros ácidos grasos linolénicos conjugados se redujeron al incrementar la temperatura del tratamiento, lo que convino en una reducción de los valores de dienos y trienos, originando un mayor poder antioxidante. Además, que Oliveira et al., (2019) encontraron que la concentración de compuestos fenólicos, ácidos grasos insaturados y sobretodo del ácido puníco del aceite de semillas de granada variedad cv Molar en Brasil, aumenta a los 80-90 días desde la antesis producida como un mecanismo de defensa.

Y por último, Cisneros et al., (2014) sometieron semillas de sachá inchi a un proceso de tostado ligero, medio y alto; observando que el índice de peróxido y el valor de p-anisidina aumentaron en las muestras de aceite extraído de semillas de sachá inchi tostadas, sin embargo, a su vez, también aumentó la concentración de algunos ácidos grasos y su capacidad antioxidante como se observa en sus resultados de los análisis de fenoles totales y DPPH protegiendo al aceite contra la oxidación y conforme la temperatura de tostado aumentaba, comparado con las semillas que no fueron tostadas. Y aunque en esta investigación no se tostaron las semillas de granada, similar comportamiento aportó el tratamiento térmico al aceite de semilla de granada, ya que conforme la temperatura del tratamiento aumentó, los valores de dienos y trienos conjugados disminuyeron, pudiendo asumirlo como una acción antioxidante o de protección propia del aceite, como un parámetro de calidad.

CONCLUSIONES

1. El rendimiento de POS disminuyó conforme la temperatura del tratamiento aumentó. El rendimiento más bajo fue de 6.95% en el tratamiento de mayor temperatura POS100. La capa protectora de la semilla de granada que es gruesa y dura impidió que se extrajera mayor cantidad de POS, quedando grandes cantidades de aceite remanente en la capa.
2. El ácido punícico es el ácido graso mayoritario en el POS de variedad Smith. Todos los cromatogramas de cada tratamiento térmico mostraron características cualitativas idénticas, y se identificaron de mayor a menor concentración los siete ácidos grasos: ácido punícico > ácido linoleico > ácido catálpico > ácido β -eleosteárico > ácido oleico > ácido palmítico > ácido esteárico.
3. El efecto de la temperatura y tiempo en los tratamientos no fueron suficientes para inactivar las lipasas, por lo que observo principalmente el aumento del ácido punícico (41.23% - 48.37%) con diferencias significativas.
4. Con el aumento de la temperatura en los tratamientos, los valores cromáticos de L*, a*, b*, C* y h° del POS aumentaron. Originando un POS más luminoso, intensificando compuestos de color verde y amarillos, e incrementando su saturación y tono.

5. Los valores de los dienos y trienos conjugados disminuyeron con respecto del tratamiento en blanco y conforme aumentó la temperatura del tratamiento. Sus coeficientes de extinción K_{232} fue mayor que el valor de K_{270} , por lo que el POS es más sensible a la oxidación primaria. Sin embargo, el tratamiento térmico provocó que disminuyeran el ácido catálpico y β -eleosteárico (otros CLnA) que en menor concentración, dan mayor poder antioxidante al POS.

6. La extracción con dióxido de carbono supercrítico no es rentable en términos cuantitativos por los bajos rendimientos, sin embargo en términos de calidad es más adecuado para emplearlo en la industria alimentaria ya que no tiene contacto con reactivos químicos, el dióxido de carbono supercrítico se puede reutilizar, extrae de manera selectiva el componente de interés y en este caso, el ácido punícico, el cual fue el mayoritario en el POS, y por sus características se puede emplear como ingrediente en formulaciones de alimentos funcionales o nutracéuticos.

RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas de extracción de aceite mediante flúidos supercríticos empleando co-solventes como etanol o agua, con parámetros de presión y temperatura mayores a los que se consideró en esta investigación.
2. Luego del proceso de molienda, retirar la mayor cantidad posible de parte leñosa de las semillas para que no interfieran en la extracción.
3. Comparar las pruebas realizadas de cromatografía de gases con el patrón del ácido punícico.
4. Evaluar el contenido de componentes fenólicos, capacidad antioxidante, acidez; índice de peróxidos, iodo, saponificación, refracción, anisidina; densidad, viscosidad y análisis microbiológicos del aceite extraído mediante CO₂ supercrítico.
5. Analizar la actividad de las lipasas y el contenido de fosfolípidos de los aceites extraídos con diferentes tratamientos.

FUENTES DE INFORMACIÓN

Electrónicas:

- Ampem, G. (2017). Quality attributes of pomegranate fruit and co-products relevant to processing and nutrition. (Tesis de Maestría). Universidad de Stellenbosch. Sudáfrica. Recuperado el 30 de enero del 2020 de: <https://scholar.sun.ac.za/handle/10019.1/101380>
- Cefla, K. (2015). Diseño de una planta para la extracción del aceite vegetal comestible de las semillas de chía (*Salvia hispánica L.*) mediante prensado. (Tesis de grado). Escuela Politécnica Nacional de Quito. Quito-Ecuador. Recupero el 22 de julio de 2019 de <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/10365/3/CD-6164.pdf>
- Churata, A. (2018). Optimización de la extracción del aceite de semillas de uva quebranta (*Vitis vinífera*) con CO₂ supercrítico, caracterización y evaluación de la actividad antioxidante. (Tesis de grado). Universidad Federico Villareal. Lima-Perú. Recuperado el 03 de setiembre del 2019 de <http://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/252380>
- Codony, R.; Guardiola, F.; Bou, R.; Tres, A. (2010). Valoración analítica y nutricional de las grasas. Departamento de Nutrición y Bromatología. Universidad de Barcelona. España. Recuperado el 21 de noviembre del 2019 de: http://www.produccionanimal.com.ar/tablas_composicion_alimentos/53-10CAP_VII.pdf

Gutiérrez, J. & Terrones, L. (2016). Caracterización fisicoquímica y estabilidad oxidativa del aceite de semilla de granada (*Punica granatum*). (Tesis de grado). Universidad Nacional del Santa. Recuperado el 27 de agosto del 2019 de:

<http://repositorio.uns.edu.pe/bitstream/handle/UNS/2993/42908.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Llaguento, L. & Romero, Y. (2014). Evaluación de la extracción de aceite de la semilla de granada (*Punica granatum*), mediante el método de arrastre con vapor. (Tesis de grado). Universidad Señor de Sipán. Pimentel-Perú. Recuperado el 25 de junio del 2019 de:

<http://repositorio.uss.edu.pe/bitstream/handle/uss/1780/INGENIERIA%20AGROINDUSTRIAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Mathias-Rettig, K. A., & Ah-Hen, K. S. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur* 42(2). Recuperado el 14 de noviembre del 2019 de: <http://agrarias.uach.cl/wp-content/uploads/2016/04/art07-Mathias.pdf>

Melgarejo, P. (2010). I Jornadas Nacionales sobre el Granado: Producción, Economía, Industrialización, Alimentación y Salud: El granado su problemática y usos. Recuperado el 18 de setiembre del 2019 de:

<http://dpvm.umh.es/docs/publicaciones/i%20jornadas%20nacionales%20sobre%20el%20granado.pdf>

Ministerio de Agricultura y Riego del Perú - SIEA. (2019). Calendario de Siembras y Cosechas. Recuperado el 02 de setiembre del 2019 de: <http://siea.minagri.gob.pe/calendario/>

Román, M., Rivera, C., Cardona, L., Muñoz, L. Gómez, D., Passaro, C., Quinceno, J. (2016). Guía de extracción por fluidos supercríticos: Fundamentos y aplicaciones. Centro de la Innovación, la Agroindustria y la Aviación. Antioquia - Colombia. Recuperado el 13 de enero del 2019 de: https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/4698/1/guia_extraccion_fluidos_supercriticos.pdf

- Uribe, J. (2016). Estudio de prefactibilidad para la instalación de una empresa productora de granada (*Punica Granatum* L. Var. Wonderful) para su comercialización en el mercado internacional. (Tesis de grado). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú. Recuperado el 15 de julio del 2019 de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2726/E21-U7-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Vásquez, A. (2015). Estimación de las coordenadas CIEL*a*b* en concentrados de tomate utilizando imágenes digitales. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Palmira-Colombia. Recuperado el 20 de enero del 2019 de: <http://bdigital.unal.edu.co/47272/>
- Zanabria, S. (2012). Extracción de aceite de las semillas de *plukenetia voluvilis* L. "sacha inchi" por fluidos supercríticos (FSC) y determinación de los ácidos grasos linolénico, linoleico y oleico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). (Tesis de grado). Universidad Católica de Santa María. Arequipa-Perú. Recuperado el 20 de agosto de 2019 de: <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/3846>
- Zorrilla, C. (2015). Influencia del tostado de la semilla de *Plukenetia huayllabambana* en el perfil de ácidos grasos y compuestos bioactivos. (Tesis de grado). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú. Recuperado el 05 de diciembre del 2019 de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/1825>

Hemerográficas:

- Ahangari, B., & Sargolzaei, J. (2012). Extraction of pomegranate seed oil using subcritical propane and supercritical carbon dioxide. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*, 46(3), 258–265. Doi: 10.1134/s0040579512030013
- Al-Muammar, M. N., & Khan, F. (2012). Obesity: The preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). *Nutrition*, 28(6), 595–604. Doi:10.1016/j.nut.2011.11.013
- Amri, Z., Lazreg-Aref, H., Mekni, M., El-Gharbi, S., Dabbaghi, O., Mechri, B., & Hammami, M. (2017). Oil Characterization and Lipids Class Composition of Pomegranate Seeds. *BioMed Research International*, 1–8. Doi:10.1155/2017/2037341
- Arora, A., & Chaudhary, S. (2012). Potential source of α – eleostearic acid from *Momordica charantia* seed oil of arid zone plants in Rajasthan, India. *International Journal of Basic and Applied Chemical Sciences*, 2, 59-62.
- Aruna, P., Venkataramanamma, D., Singh, A. K., & Singh, R. P. (2016). Health benefits of puniic acid: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 16-27. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12171>.
- Aruna, P., Manohar, B., & Singh, R. P. (2018). Processing of pomegranate seed waste and mass transfer studies of extraction of pomegranate seed oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(5). Doi:10.1111/jfpp.13609
- Boekel, M. van; Fogliano, V.; Pellegrini, N.; Station, C.; Scholz, G.; Lalljie, S.; Somoza, V.; Knorr, D.; Jasti, P.; Eisenbrand, G. (2010). A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular Nutrition & Food Research* 54(9). 1215-1247. Doi:10.1002/mnfr.200900608
- Brosnan, T., Sun, D. W. (2004). Improving quality inspection of food products by computer vision - a review. *Journal of Food Engineering*, 61(1): 3-16. DOI: 10.1016/S0260-8774(03)00183-3.

- Caligiani, A., Bonzanini, F., Palla, G., Cirlini, M., & Bruni, R. (2010). Characterization of a Potential Nutraceutical Ingredient: Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil Unsaponifiable Fraction. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 277–283. Doi: 10.1007/s11130-010-0173-5
- Carvalho, E., Melo, I., Mancini-Filho, J. (2010). Chemical and physiological aspects of isomers of conjugated fatty acids. *Food Science and Technology (Campinas)*, 30(2), 295-307. Doi: 10.1590/s0101-20612010000200002
- Ceyhun-Sezgin, A., & Artik, N. (2017). The Fatty Acid Composition of Pomegranates Grown in Turkey. *International Journal of Bioprocess and Biotechnological Advancements*, 2(1), 81-87. Recuperado el 10 de diciembre de 2019 de:
<https://www.scitcentral.com/article/41/138/The-Fatty-Acid-Composition-of-Pomegranates-Grown-in--Turkey#tabs6>
- Cisneros, F. H., Paredes, D., Arana, A., & Cisneros-Zevallos, L. (2014). Chemical Composition, Oxidative Stability and Antioxidant Capacity of Oil Extracted from Roasted Seeds of Sacha-Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(22), 5191–5197. Doi: 10.1021/jf500936j
- Dhia. F. A., & Sawsan, A. A. (2016). Fatty Acids Composition by (GC-MS) and Most Important Physical Chemicals Parameters of Seed Oil Pomegranate and Grape Seed. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 6(8), 26-32. <https://www.iiste.org/Journals/index.php/JBAH/article/view/30010/30812>
- Dorado, D. J., Hurtado-Benavides, A. M., & Martínez-Correa, H. A. (2016). Extracción con CO₂ Supercrítico de Aceite de Semillas de Guanábana (*Annona muricata*): Cinética, Perfil de Ácidos Grasos y Esteroles. *Información Tecnológica*, 27(5), 37–48. Doi: 10.4067/s0718-07642016000500005
- Eikani, M. H., Golmohammad, F., & Homami, S. S. (2012). Extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using superheated hexane. *Food and Bioproducts Processing*, 90(1), 32–36. Doi:10.1016/j.fbp.2011.01.002

- Elfalleh, W., Ying, M., Nasri, N., Sheng-Hua, H., Guasmi, F., & Ferchichi, A. (2011). Fatty acids from Tunisian and Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(3), 200–206. doi:10.3109/09637486.2010.526932
- Fernandes, L., Pereira, J. A., López-Cortés, I., Salazar, D. M., Ramalhosa, E., & Casal, S. (2015). Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils from nine different pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, 13-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2014.11.006>
- Fiori, L. (2010). Supercritical extraction of grape seed oil at industrial-scale: Plant and process design, modeling, economic feasibility. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 49(8), 866–872. Doi:10.1016/j.cep.2010.06.001
- Gupta, D. & Kaur, P. (2016). Physiochemical evaluation and in vitro antioxidant activity of few wonder seeds original article. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 8(7), 98-104. Recuperado el 16 de enero del 2020 de:
www.researchgate.net/publication/304715641_PHYSIOCHEMICAL_EVALUATION_AND_IN_VITRO_ANTIOXIDANT_ACTIVITY_OF_FEWS_WONDER_SEEDS_Original_Article
- Habibnia, M., Ghavami, M., Ansaripour, M., Vosough, S. (2012). Chemical evaluation of oils extracted from five different varieties of Iranian pomegranate seeds. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 2, 35–40. Recuperado el 22 de enero de 2020 de:
http://jfbt.srbiau.ac.ir/article_1285_2ba1c50050d324b0aa52d0bd5a9286c1.pdf
- Hennessy, A., Ross, R., Devery, R., Stanton, C. (2010). The health promoting properties of the conjugated isomers of α -linolenic acid. *Lipids*, 46(2), 105-119. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-010-3501-5>.

- Holic, R., Xu, Y., Caldo, K., Singer, S., Field, C., Weselake, R., Chen, G. (2018). Bioactivity and biotechnological production of puniic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102(3). 3537-3549. Doi: 10.1007/s00253-018-8883-y.
- Huang, Zhen & Shi, Xiao-Han & Jiang, Wei-Juan. (2012). Theoretical models for supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*. 1250. 2-26. Doi: 10.1016/j.chroma.2012.04.032.
- Ichihara, K., & Fukubayashi, Y. (2009). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*. 51 (3): 635 – 40. Doi: 10.1194/jlr.D001065.
- Jing, P., Ye, T., Shi, H., Sheng, Y., Slavin, M., Gao, B., Liu, L., & Yu, L. (2012). Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seeds. *Food Chemistry*, 132(3), 1457-1464. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.002>.
- Johanningsmeier, S. & D., Harris, G. (2011). Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Annual Review of Food Science Technolgy*; 2: 181-201. Doi: 10.1146/annurev-food-030810-153709.
- Khadiji, A., Mirheidari, F., Moradi, Y., Paryan, S. (2020). Morphological variability of wild pomegranate (*Punica granatum* L.) accessions from natural habitats in the Northern parts of Iran. *Scientia Horticulturae*, 264, 109-165. Doi: 10.1016/j.scienta.2019.109165
- Kalamara, E., Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2015). An integrated process for utilization of pomegranate wastes — Seeds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 144–153. Doi: 10.1016/j.ifset.2014.12.001
- Keskin, Hasene & Koçak, Derya & Gök, Uğur & Gögüs, Fahrettin. (2017). Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil and Evaluation of Its Physicochemical and Bioactive Properties. *Food Technology and Biotechnology*. 55. Doi: 10.17113/ftb.55.01.17.4638.

- Khoddami, A., Man, Y. B. C., & Roberts, T. H. (2014). Physico-chemical properties and fatty acid profile of seed oils from pomegranate (*Punica granatum* L.) extracted by cold pressing. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(5), 553-562. Doi: 10.1002/ejlt.201300416
- Koba, K. & Yanagita, T. (2011). Potential Health Benefits of Pomegranate (*Punica granatum*) Seed Oil Containing Conjugated Linolenic Acid. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. 108. 919-924. Doi: 10.1016/B978-0-12-375688-6.10108-2
- Liu, G., Xu, X., Gong, Y., He, L., Gao, Y. (2012). Effects of supercritical CO₂ extraction parameters on chemical composition and free radical-scavenging activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. *Food and Bioprocess Technology*, 90(3), 573–578. Doi:10.1016/j.fbp.2011.11.004
- Mahesar, S. A., Kori, A. H., Sherazi, S. T. H., Kandhro, A. A., & Laghari, Z. H. (2019). Pomegranate (*Punica granatum*) Seed Oil. Mohamed Fawzy Ramadan (Ed.). *Fruit Oils: Chemistry and Functionality*, 37, 691–709. Doi: 10.1007/978-3-030-12473-1
- Melo, I. L. P., Carvalho, E. B. T., & Mancini-Filho, J. (2014). Pomegranate seed oil (*Punica granatum* L.): a source of punicic acid (conjugated α -linolenic acid). *Journal of Human Nutrition & Food Science*, 2, 1-11. Recuperado el 11 de diciembre del 2019 de:
https://www.researchgate.net/publication/260943550_Pomegranate_Seed_Oil_Punica_Granatum_L_A_Source_of_Punicic_Acid_Conjugated_alpha-Linolenic_Acid
- Natolino, A., & Da Porto, C. (2019). Supercritical carbon dioxide extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil: Kinetic modelling and solubility evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 151, 30–39. Doi:10.1016/j.supflu.2019.05.002

- Oliveira, A., Araújo, R., Alves, K., Onias, E., Candeia, R., Lopes, M., Lima, J., Barbosa, L., Dias, G. (2019). Composition of Fatty Acids and Antioxidant Activity of Pomegranate Seed Oil CV. Molar. *Journal of Experimental Agriculture International*, 37(3), 1-9. Recuperado el 06 de noviembre del 2019 de:
<https://www.journaljeai.com/index.php/JEAI/article/view/30267/56915>
- Özyurt, H. (2019). The comparison of the Quality Properties of Some Commercial Cold Pressed Seed Oils. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 6 (2), 149-156. Doi: 10.18596/jotcsa.496458
- Parashar, A., Sinha, N., Singh, P. (2010). Lipid contents and fatty acids composition of seed oil from twenty five pomegranates varieties grown in India. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2, 12-15. Recuperado el 20 de diciembre de 2019 de:
<https://maxwellsci.com/print/ajfst/v2-12-15.pdf>
- Ruge, C., Changzhong, R., & Zaigui, L. (2012). The effects of different inactivation treatments on the storage properties and sensory quality of naked oat. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1853–1859. Doi: 10.1007/s11947-011-0551-5
- Saha, S. S., Patra, M., & Ghosh, M. (2012). In vitro antioxidant study of vegetable oils containing conjugated linolenic acid isomers. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 10–15. Doi: 10.1016/j.lwt.2011.11.008
- Sanja Đurđević, Stoja Milovanović, Katarina Šavikin, Mihailo Ristić, Nebojša Menković, Dejan Pljevljakušić, Slobodan Petrović, Aleksandra Bogdanović. (2017). Improvement of supercritical CO₂ and n-hexane extraction of wild growing pomegranate seed oil by microwave pretreatment. *Industrial crops and products*, 104, 21-27. Doi: 10.1016/j.indcrop.2017.04.024
- Sassano, G., Sanderson, P., Franx, J., Groot, P., van Straalen, J., & Bassaganya-Riera, J. (2009). Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(6), 1046–1052. Doi:10.1002/jsfa.3552

- Shabbir, M. A., Khan, M. R., Saeed, M., Pasha, I., Khalil, A. A., & Siraj, N. (2017). Punicic acid: A striking health substance to combat metabolic syndromes in humans. *Lipids in Health and Disease*, 16(1). Doi: 10.1186/s12944-017-0489-3
- Shaygannia, E., Bahmani, M., Zamanzad, B., & Rafieian-Kopaei, M. (2015). A Review Study on *Punica granatum* L. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 21(3), 221–227. Doi: 10.1177/2156587215598039
- Siano, F., Addeo, F., Volpe, M. G., Paolucci, M., & Picariello, G. (2016). Oxidative Stability of Pomegranate (*Punica Granatum* L.) Seed Oil to Stimulated Gastric Conditions and Thermal Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(44), 8369-8378. Doi: 10.1021/acs.jafc.6b04611
- Silva, L., Ranquinea, L., Monteirob, M., Torres, A. (2019). Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil enriched with conjugated linolenic acid (cLnA), phenolic compounds and tocopherols: Improved extraction of a specialty oil by supercritical CO₂. *The journal of supercritical fluids*. 147. 126-137. Doi: 10.1016/j.supflu.2019.02.019
- Sovová, H. (2017). Broken-and-intact cell model for supercritical fluid extraction: its origin and limits. *Journal of supercritical fluids*. 129. 3–8. Doi: 10.1016/j.supflu.2017.02.014.
- Tanaka, T., Hosokawa, M., Yasui, Y., Ishigamori, R., & Miyashita, K. (2011). Cancer Chemopreventive Ability of Conjugated Linolenic Acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(11), 7495–7509. Doi: 10.3390/ijms12117495
- Tian, Y., Xu, Z., Zheng, B., & Martin Lo, Y. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 202–208. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.07.010

- Topkafa, M., Kara, H., & Sherazi, S. T. H. (2015). Evaluation of the Triglyceride Composition of Pomegranate Seed Oil by RP-HPLC Followed by GC-MS. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 92(6), 791–800. Doi: 10.1007/s11746-015-2652-1.
- Touihri, I., Kallech-Ziri, O., Boulila, A., Fatnassi, S., Marrakchi, N., Luis, J., & Hanchi, B. (2015). Ecballium elaterium (L.) A. Rich. Seed oil: Chemical composition and antiproliferative effect on human colonic adenocarcinoma and fibrosarcoma cancer cell lines. *Arabian Journal of Chemistry*. Doi:10.1016/j.arabjc.2015.02.023
- Tran, H. N. A., Bae, S.-Y., Song, B.-H., Lee, B.-H., Bae, Y.-S., Kim, Y.-H., Newman, R. A. (2010). Pomegranate (Punica granatum) Seed Linolenic Acid Isomers: Concentration-Dependent Modulation of Estrogen Receptor Activity. *Endocrine Research*, 35(1), 1–16. Doi: 10.3109/07435800903524161
- Turtygin, A.V., Deineka, V.I. & Deineka, L.A. (2013). Determination of the triglyceride composition of pomegranate seed oil by reversed-phase HPLC and spectrophotometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 68(6), 558-563. Doi: 10.1134/s1061934813060142
- Ullah, S., Hussain, S. A., Shaukat, F., Hameed, A., Yang, W., & Song, Y. (2019). Antioxidant Potential and the Characterization of Arachis hypogaea Roots. *BioMed Research International*, 1–9. Doi:10.1155/2019/7073456
- Verardo, V., Garcia-Salas, P., Baldi, E., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Caboni, M. F. (2014). Pomegranate seeds as a source of nutraceutical oil naturally rich in bioactive lipids. *Food Research International*, 65, 445–452. Doi: 10.1016/j.foodres.2014.04.044
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 635-654. Doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x

- Yang, L., Cao, Y., Chen, J.-N., & Chen, Z.-Y. (2009). Oxidative Stability of Conjugated Linolenic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4212–4217. Doi: 10.1021/jf900657f
- Yoshime, L. T., Melo, I. L. P. de, Sattler, J. A. G., Torres, R. P., & Mancini-Filho, J. (2018). Bioactive compounds and the antioxidant capacities of seed oils from pomegranate (*Punica granatum* L.) and bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Food Science and Technology*. Doi: 10.1590/fst.23218
- Yuan, G.F., Chen, X.-E., & Li, D. (2014). Conjugated linolenic acids and their bioactivities: a review. *Food & Function*, 5(7), 1360-1368. <http://dx.doi.org/10.1039/c4fo00037d>. PMID: 24760201.

ANEXOS

Tabla 11. Comparación extracción CO₂ supercrítico y Soxhlet

	CO₂ supercrítico (320 bar, 60°C, 8 kg/h CO₂)	Soxhlet (con n- hexano, 6 horas y temperatura de 70°C)
Rendimiento (g aceite/g solido insoluble)	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Estabilidad oxidativa (mg α-tocoferol/ml aceite)	3.5 ± 0.6	1.5 ± 0.1
Ácido palmítico	3.3 ± 0.4	3.7 ± 0.1
Ácido esteárico	1.49 ± 0.03	1.73 ± 0.02
Ácido oléico	3.9 ± 0.2	4.2 ± 0.1
Ácido linoléico	5.9 ± 0.2	6.1 ± 0.3
Ácido punícico	85.4 ± 0.4	84.2 ± 0.4

Fuente: Natolino & Da porto, (2019)



Figura 5. Parte leñosa dura de la semilla de granada

Elaboración: La autora

Tabla 12. Comparación de tiempos de retención del ácido punícico

Matriz	Tiempo de retención	Fuente
Granada	11.53 min	Gupta et al., (2016)
Granada	12.47 min	Ceyhun-Sezgin & Artik, (2017)
Pepinillo del diablo	13.258 min	Touihri et al., (2015)
Granada	13.32 min	Aruna et al., (2018)
Granada	14.66 min	Turtygin et al., (2013)
Granada	16.03 min	Dhia & Sawsan (2016)
Raíces de la planta de maní	18.33 min	Ullah et al., (2019)
Granada	19.89 min	Presente investigación
Granada	35.5 min	Tran et al., (2010)

Elaboración: La autora

Tabla 13. Composición de ácidos grasos en aceite de semilla de granada

Ácido graso	Variedad de India	Variedad China y Túnez	Variedad Turquía	Variedad USA	Variedad Brazil
14:0	0.7 ± 1.5	0.18 ± 0.21		0.35 ± 0.10	
16:0	5.7 ± 4.1	5.07 ± 1.30	2.45 ± 0.19	4.00 ± 0.76	4.04 ± 0.34
18:0	2.1 ± 3.1	4.20 ± 1.56	1.52 ± 0.26	2.92 ± 0.56	2.30 ± 0.21
18:1 (ω-9)	9.0 ± 5.6	7.86 ± 2.25	4.19 ± 0.61	5.68 ± 1.69	5.29 ± 0.25
18:2 (ω-6)	10.8 ± 6.9	8.36 ± 2.36	4.49 ± 0.49	4.08 ± 1.04	6.05 ± 0.53
18:3 (9c,11t,13t)		10.70 ± 4.44	6.41 ± 0.27		
18:3 (9t,11t,13t)		8.78 ± 5.16	1.03 ± 0.16		
18:3 (9t,11t,13c)		15.24 ± 6.17	3.48 ± 0.34		
18:3 (9c,11t,13c)	71.5 ± 17.9	36.98 ± 10.12	74.11 ± 1.55	81.22 ± 2.15	58.14 ± 2.10
20:0		0.69 ± 0.14	0.39 ± 0.04	0.53 ± 0.18	0.50 ± 0.04
20:1		1.65 ± 1.85	0.61 ± 0.09		0.61 ± 0.05
22:0			0.18 ± 0.02		
24:0		0.97 ± 0.94		1.00 ± 0.24	

Fuente: Melo et al., (2014)

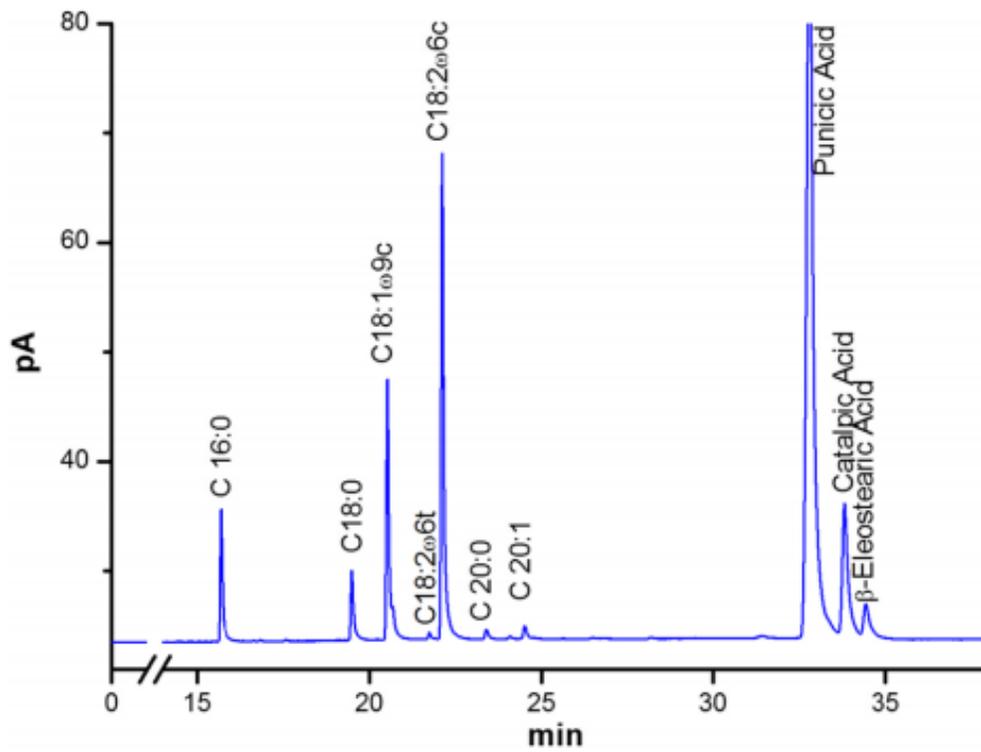


Figura 6. Perfil de ácidos grasos de aceite de semilla de granada
Fuente: Topkafa, Kara & Sherazi (2015)

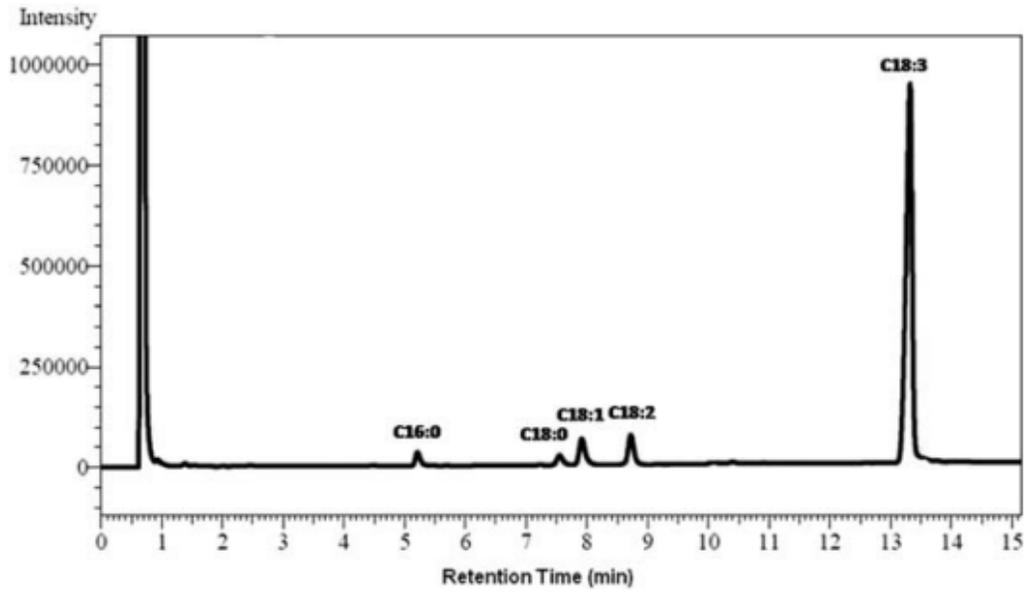


Figura 7. Cromatograma de FAMES en aceite de semilla de granada
Fuente: Aruna, Manohar & Singh (2018)

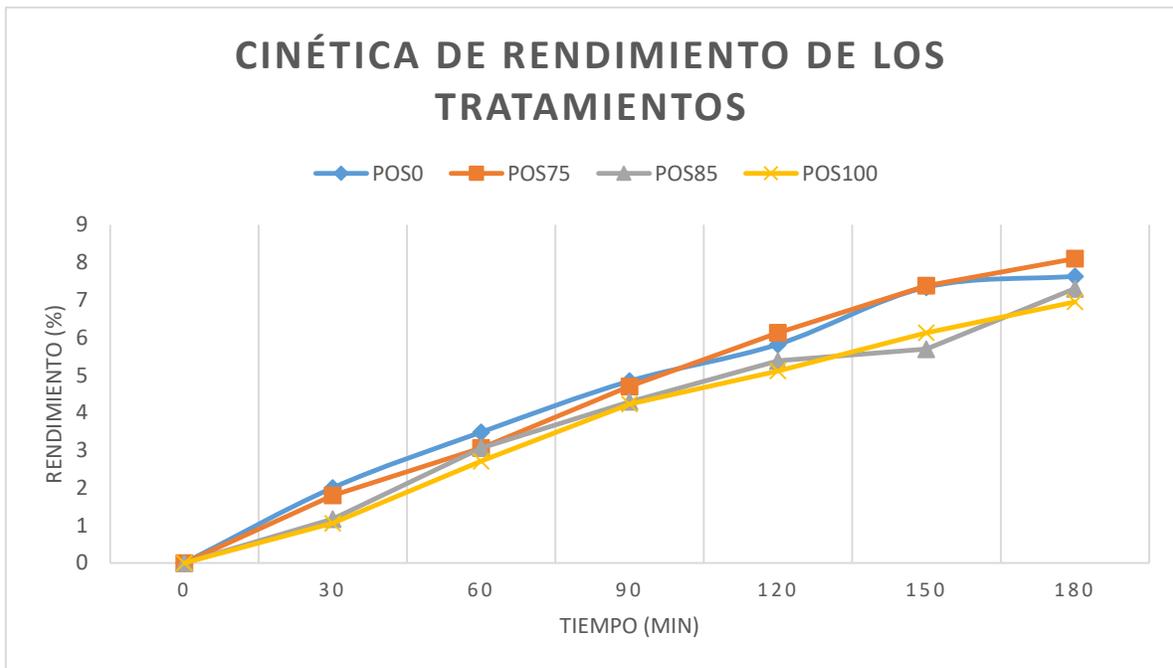


Figura 8. Cinética de rendimiento de los tratamientos
Elaboración: La autora